

Bestimmung von Kopienzahlveränderungen
und Methylierungen der Promotorregion
von Tumorsuppressorgen
bei Hirntumoren verschiedener Entitäten
mittels MS-MLPA

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
„doctor medicinae“ (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der medizinischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

Thomas Hoffmann
geb. am 11.01.1982
in Schlema

Gutachter:

1. Prof. Dr. T. Deufel (Universität Jena)
2. Prof. Dr. M. Dürst (Universität Jena)
3. Prof. Dr. M. Nöthen (Universität Bonn)

Tag der öffentlichen Verteidigung: 03.06.2008

Abkürzungsverzeichnis

CGH	<i>comparative genomic hybridisation</i>
CUP	<i>Carcinom of unknown primarius</i>
DNS	Desoxyribonukleinsäure
g	Gramm
HE	Hämatoxylin-Eosin
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
kB	Kilobasen
kD	Kilodalton
LOH	<i>loss of heterozygosity</i>
Max	Maximum
Mb	Megabasen
Min	Minimum
MLPA	<i>multiplex ligation-dependent probe amplification</i>
MS-MLPA	<i>methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification</i>
mg	Milligramm
ng	Nanogramm
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
TSG	Tumorsuppressorgen
WHO	<i>world health organisation</i>

Inhaltsverzeichnis

<u>Zusammenfassung</u>	1
<u>1. Einleitung</u>	3
<i>1.1. Intrakranielle Tumoren / Neoplasien des Zentralnervensystems</i>	3
1.1.1. Meningeome	5
1.1.2. Glioblastome	9
1.1.3. Intrakranielle Metastasen	10
<i>1.2. Tumorsuppressorgene</i>	11
1.2.1. Zelluläre Funktion und Bedeutung ausgewählter Tumorsuppressorgene	12
1.2.1.1. p53	13
1.2.1.2. CDKN2A	14
1.2.1.3. RB	14
1.2.1.4. BRCA1 und BRCA2	15
1.2.2. Inaktivierungsmechanismen	16
1.2.2.1. Punktmutationen	16
1.2.2.2. Deletionen	17
1.2.2.3. Amplifikationen	17
1.2.2.4. Promotormethylierungen	18
1.2.3. Bedeutung der Erfassung inaktivierter Tumorsuppressorgene	19
<i>1.3. Methoden zur Erfassung von Aberrationen von Tumorsuppressorgenen</i>	20
1.3.1. Herkömmliche Methoden	20
1.3.1.1. Karyotypisierung	20
1.3.1.2. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung	20
1.3.1.3. Vergleichende Genomhybridisierung	20
1.3.1.4. Mikrosatelliten-basierter Nachweis von Heterozygositätsverlusten	21
1.3.2. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)	22
1.3.2.1. Prinzip des MLPA-Verfahrens	22
1.3.2.2. Prinzip des MS-MLPA-Verfahrens	24
<u>2. Zielstellung</u>	26

<u>3. Material und Methoden</u>	27
3.1. Statistische Angaben der untersuchten Tumorproben	27
3.2. Aufarbeitung der Tumorproben	29
3.3. Untersuchte Tumorsuppressorgene	29
3.4. Densitometrie	31
3.5. Detektion von Aberrationen	34
 <u>4. Ergebnisse</u>	 35
4.1. Histopathologie der untersuchten Tumoren	35
4.1.1. Meningeome	35
4.1.2. Glioblastome	36
4.1.3. Intrakranielle Metastasen	36
4.2. Qualität der Tumorproben	38
4.3. Rohdaten aus der Visualisierung der MLPA-Reaktion	39
4.4. Häufigkeit von Kopienzahlveränderungen	41
4.4.1. Häufigkeit der Kopienzahlveränderungen der verschiedenen Entitäten	49
4.4.2. Häufig betroffene Genabschnitte / Tumorsuppressorgene	51
4.4.2.1. VHL	51
4.4.2.2. BRCA1	52
4.4.2.3. PYCARD	52
4.4.2.4. IL2	52
4.4.2.5. CDK6	52
4.5. Vergleich der Gesamthäufigkeit von Deletionen und Amplifikationen	53
4.6. Häufigkeit von Promotormethylierungen	53
4.6.1. Promotormethylierungen der verschiedenen Entitäten	58
4.6.2. Häufig betroffene Genabschnitte / Tumorsuppressorgene	59
4.6.2.1. RASSF1A	59
4.6.2.2. WT1	59
4.6.2.3. CASP8, CD44 und ESRI	60
4.7. Ergebnisübersicht	60

<u>5. Diskussion</u>	63
5.1. Einordnung des Studiendesigns	63
5.2. Kopienzahlveränderungen der verschiedenen Entitäten	65
5.2.1. Meningeome	65
5.2.1.1. Häufigkeit von Kopienzahlveränderungen	65
5.2.1.2. Deletionen	66
5.2.1.3. Amplifikationen	68
5.2.2. Gliome	68
5.2.2.1. Häufigkeit von Kopienzahlveränderungen	68
5.2.2.2. Deletionen	68
5.2.2.3. Amplifikationen	69
5.2.3. Intrakranielle Metastasen	70
5.2.3.1. Häufigkeit von Kopienzahlveränderungen	70
5.2.3.2. Deletionen	70
5.2.3.3. Amplifikationen	70
5.3. Promotormethylierungen der verschiedenen Entitäten	71
5.3.1. Meningeome	71
5.3.2. Gliome	71
5.3.3. Intrakranielle Metastasen	72
5.4. Möglichkeiten und Grenzen des MLPA-Verfahrens	73
5.5. Ausblick	74
 <u>6. Schlussfolgerungen</u>	 75
 <u>7. Literaturverzeichnis</u>	 76
 <u>8. Anhang</u>	 87

Zusammenfassung

Molekularbiologische Untersuchungen nehmen einen zunehmenden Stellenwert in der Beschreibung von Tumoren ein. Neben neuen Erkenntnissen hinsichtlich der Ätiologie und Progression ermöglicht die Erfassung genetischer und epigenetischer Veränderungen zunehmend auch diagnostische und prognostische Aussagen. Herkömmliche Methoden zum Nachweis genetischer Aberrationen wie Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH), vergleichende genomische Hybridisierung (*comparative genomic hybridisation* = CGH) oder der Nachweis von Verlusten der Heterozygotität (*loss of heterozygosity* = LOH) sind besonders bei multiplexen Untersuchungen aufwendig, benötigen große Mengen DNS oder sind für Untersuchungen an soliden Tumoren nur eingeschränkt anwendbar. Im Vergleich dazu ermöglicht das *multiplex ligation-dependent probe amplification*-Verfahren (MLPA) die Detektion von Kopienzahlveränderungen bei einfacher Anwendung, hoher Spezifität und multiplexem Studiendesign. Zusätzlich können mit einer Erweiterung des Verfahrens (*methylation-specific*-MLPA = MS-MLPA) Methylierungen der untersuchten Abschnitte erfasst werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden Kopienzahlveränderungen und Promotormethylierungen bei intrakraniellen Tumoren mit Hilfe des MS-MLPA Verfahrens erfasst. Unter Anwendung zweier kommerzieller MS-MLPA Probensätze wurden insgesamt 53 verschiedene Tumorsuppressorgene untersucht. Für die Untersuchung standen insgesamt 29 Hirntumoren zur Verfügung, darunter 15 Meningeome (10 x Grad I, 3 x Grad II und 2 x Grad III), 7 Gliome (6 Glioblastome und 1 Astrozytom Grad III) sowie 7 intrakranielle Metastasen unterschiedlicher Primarien (2 x Rektum-Ca, 2 x Mamma-Ca, 1 x Nierenzell-Ca, 1 x malignes Melanom, 1 x CUP).

In einem ersten Schritt wurden die verfügbaren Gewebeproben bezüglich ihrer Zusammensetzung charakterisiert. Dazu wurden mikroskopische Präparate in Hämatoxylin-Eosin-Färbung angefertigt. Neben der bestätigenden Erfassung histopathologischer Merkmale wurde so ein Tumoranteil von mehr als 50% in den weiter zu untersuchenden Proben garantiert. Extraktion genomischer DNS und das MS-MLPA-Verfahren folgten Standardprozeduren bzw. wurden nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgt mangels vergleichbarer Referenzstudien nach einem selbst erstellten Algorithmus.

Sowohl innerhalb der untersuchten Entitäten als auch im Gesamtvergleich der detektierten Kopienzahlveränderungen überwiegen Deletionen (176) gegenüber Amplifikationen (97).

Aufgrund der spezifischen Untersuchung von Tumorsuppressorgenen, welche in Tumoren häufiger deletiert als amplifiziert sind, bestätigt dieses Ergebnis die Aussagekraft des MLPA-Verfahrens.

Die unspezifische Untersuchung der Tumorsuppressorgene mit Hilfe der beiden o. g. Kits erschwert einen Vergleich zwischen erhobenen und bekannten Aberrationen. Dennoch konnten vergleichbare Aberrationen z.B. der Tumorsuppressorgene PTEN oder CDKN2A bei Gliomen oder des Tumorsuppressorgens GATA5 bei intrakraniellen Metastasen erhoben werden. Des Weiteren ermöglichen die detektierten Kopienzahlveränderungen auch eine Aussage hinsichtlich vermutlicher Aberrationen benachbarter Abschnitte (z.B. NF2 und TIMP3) und Deletionen größerer Abschnitte.

Innerhalb der untersuchten Tumorproben zeigt sich eine quantitative Abhängigkeit der Aberrationen vom Malignitätsgrad der untersuchten Entitäten. Dabei können bereits innerhalb der Gruppe der Meningeome Unterschiede in der Häufigkeitsverteilung in Abhängigkeit vom Malignitätsgrad festgestellt werden. Während die untersuchten Gliome vergleichbar häufig Kopienzahlveränderungen wie höhergradige Meningeome aufweisen, sind die untersuchten intrakraniellen Metastasen mit Abstand am häufigsten von Aberrationen betroffen.

Analog der Verteilung der Kopienzahlveränderungen konnten bei Tumoren hoher Malignität häufiger Promotormethylierungen nachgewiesen werden. Dabei wiesen die untersuchten intrakraniellen Metastasen erneut am häufigsten Promotermethylierungen auf. Darüber hinaus konnten besonders bei den untersuchten Gliomen mit anderen Studien vergleichbar häufige Promotormethylierungen der Tumorsuppressorgene RASSF1A und CASP8 detektiert werden. Im Hinblick auf ein verbessertes Verständnis der Tumorbiologie und der Erschließung neuer therapeutischer Möglichkeiten sollte die Erfassung tumorspezifischer

Kopienzahlveränderungen und Promotormethylierungen Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Das MS-MLPA-Verfahren bietet dabei neben einer einfachen und genauen Erfassung der Kopienzahl einzelner Abschnitte auch die Möglichkeit der Detektion epigenetischer Veränderungen (Methylierungen).

1. Einleitung

1. 1. Intrakranielle Tumoren / Neoplasien des Zentralnervensystems

Neoplasien des Zentralnervensystems umfassen sowohl die eigentlichen Hirngeschwülste als auch die Tumoren der peripheren Nerven und Hirnhäute (Pietsch 2002). Dabei umfasst die heterogene Gruppe der Tumoren des zentralen Nervensystems Neoplasien verschiedener Entitäten mit unterschiedlicher Histogenese und variierendem biologischem Verhalten. Bei einem ersten Versuch der Klassifikation der Tumoren des Zentralnervensystems stützte sich die Namensgebung zunächst auf die im Tumor quantitativ dominierende Zellart (Bailey und Cushing 1926). Neuere Einteilungen beruhen auf einer Unterteilung nach Art der Ursprungszelle und Lokalisation, wobei 1997 in einer weiteren Klassifikation auch eine Zuordnung von molekularbiologischen Erkenntnissen der jeweiligen Tumoren gegeben wurde (Kleihues und Cavenee 1997). Die positive Resonanz auf dieses Werk veranlasste die WHO zur Herausgabe der aktuellen Klassifikation der Hirntumore unter pathologischen und molekularbiologischen Gesichtspunkten (siehe Tabelle 1) (Radner *et al.* 2002).

Diese aktuelle Klassifikation beinhaltet nicht nur die histopathologischen Merkmale der verschiedenen Entitäten, sondern gibt zugleich mit Hilfe einer 4-stufigen Graduierung eine Aussage über die Malignität der Tumoren. Sie dient neben der Klassifikation auch zur Abschätzung einer Prognose und in der klinischen Anwendung zur postoperativen Therapieplanung (Radner *et al.* 2002), wobei sich in den unterschiedlichen klinischen Verläufen erneut die große Diversität der verschiedenen Tumorentitäten manifestiert.

1. Neuroepitheliale Tumoren

- *Astrozytäre Tumoren (I-IV)*
- *Oligodendrogliale Tumoren (II-III)*
- *Mischgliome (II-III)*
- *Ependymale Tumoren (I-III)*
- *Tumoren des Plexus choroideus (I, III)*
- *Gliale Tumoren
unklaren Ursprungs (I-IV)*
- *Neuronale und gemischt glioneuronale
Tumoren (I-IV)*
- *Neuroblastäre Tumoren (IV)*
- *Pinealistumoren (II, IV)*

2. Embryonale Tumoren

3. Tumoren der Meningen

- *Meningotheliale Tumoren
(Meningeome) (I-III)*
- *Mesenchymale, nicht-meningotheliale
Tumoren (II, III)*
- *Primäre, melanozytäre Tumoren (II, III)*
- *Tumoren unklarer Histogenese (I)*

4. Tumoren der Sellaregion

5. Tumoren der peripheren Nerven

- *Neurinom (I)*
- *Neurofibrom (I)*
- *Perineurinom (I)*
- *Maligner, peripherer
Nervenscheidentumor (III, IV)*

6. Lymphome und hämatopoetische Tumoren

7. Keimzelltumoren

8. Metastatische Tumoren

Tabelle 1. Aktuelle WHO-Klassifikation der Tumoren des Nervensystems. In Klammern Zuordnung zu Malignitätsgraden I-IV. (vereinfacht nach Radner et al. 2002; nur Oberkategorien aufgezählt)

Primäre Hirntumoren verursachen etwa 3 bis 5 % aller tumorbedingten Todesfälle (Fine 1994). Dabei nehmen die Tumoren des Zentralnervensystems mit einem Anteil von rund 2 % aller Neoplasien (Kleihues *et al.* 1997) nur einen geringen Teil der Tumorerkrankungen bei Erwachsenen ein, wobei ihnen aber aufgrund ihrer Lokalisation und ihres klinischen Verlaufes eine besondere Bedeutung beizumessen ist.

Bei Kindern und Jugendlichen wiederum stellen Tumoren des Zentralnervensystems nach Leukämien und Lymphomen die zweithäufigste neoplastische Erkrankung dar (Pietsch 2002),

womit Hirntumoren zu den fünf häufigsten Krebslokalisationen bei der tumorverursachten Mortalität in der jungen Bevölkerung zählen (Boing 1993). Dabei ist bei den unterschiedlichen Entitäten der Neoplasien des Zentralnervensystems bereits ein spezifischer Häufigkeitsgipfel erkennbar. Während im Erwachsenenalter die glialen Neoplasien überwiegen, treten embryonale Tumoren des zentralen Nervensystems gehäuft im Kindes – und Jugendalter auf (Pietsch 2002).

Epidemiologische Studien zur Inzidenz und Prävalenz zerebraler Tumoren haben häufig ein an bestimmte geographische Gebiete oder Populationsgruppen orientiertes Design. Schätzungen gehen deutschlandweit von einer Gesamtinzidenz von sowohl benignen als auch malignen intrakraniellen Tumoren von 20 Fällen bei 100.000 Personen aus, wobei Daten von sowohl primären als auch sekundären Hirntumoren in diese Statistik eingeflossen sind (Stark *et al.* 2005). Im Blickpunkt dieser Untersuchung sollen mit Meningeomen, Glioblastomen und Hirnmetastasen verschiedener Primarien 3 Tumorentitäten aus jeweils unterschiedlichen Ursprungsgeweben stehen.

1. 1. 1. Meningeome

Im Rahmen eines Autopsiereports durch Felix Plater wurden Meningeome erstmals im Jahre 1614 als „*ein runder, fleischiger, harter Tumor, voll von Löchern und etwa so groß wie ein mittlerer Apfel*“ beschrieben. Unter der Bezeichnung „*fungus durae matris*“ erwähnte der französische Chirurg Antoine Louis 1774 erstmals Meningeome in einem wissenschaftlichen Report. 1831 und 1834 folgten Abbildungen in Form von Lithographien durch Bright und Cruveilhier in pathologischen Atlanten (*nach* Bondy und Ligon 1996).

Rudolf Virchow versah im Jahre 1847 Meningeome in Folge seiner Entdeckung der Granulationen innerhalb des Tumorgewebes mit dem Attribut „*psammonartig*“, also sandartig. Nach den Bezeichnungen als „*Epitheliom*“ durch Bouchard im Jahre 1864 und als „*Endotheliom*“ durch Camillo Golgi im Jahre 1869 wurde schließlich der Begriff des Meningeoms durch Harvey Cushing im Jahre 1927 geprägt (*nach* Bondy und Ligon 1996).

Meningeome entstehen aus meningoethelialen bzw. arachnoidalen Zellen der Dura mater und sind somit neuroektodermalen Ursprungs (Langford 1996). Mit einem Anteil von 13 bis 26 % sind Meningeome die zweithäufigste Tumorentität unter den primären Tumoren des Zentralnervensystems (Liu *et. al* 2005). Die Zahl der jährlichen Neuerkrankungen beträgt 6 pro 100.000 Personen (Collins 2004). Da Meningeome auch einen asymptomatischen klinischen Verlauf haben können, resultiert inklusive der Erhebungen aus der post-mortem-Diagnostik eine Lebenszeitprävalenz von 1,5% (Zang 2001).

Besonders auffällig bei der Betrachtung von Inzidenz- und Prävalenzraten von Meningeomen ist eine deutliche Bevorzugung des weiblichen Geschlechts, während alle anderen Hirntumoren bei der Häufigkeitsverteilung eine geringe Tendenz zum männlichen Geschlecht aufweisen (Bondy und Ligon 1996). Bei der Betrachtung der Inzidenzspitzen von Meningeomen zeigt sich ein Häufigkeitsgipfel der Neuerkrankungen bei Frauen mit 7,5 Fällen pro 100.000 in der achten Lebensdekade und bei Männern mit 6,0 Fällen pro 100.000 in der siebten Lebensdekade (Rohringer *et al.* 1989). Das mittlere Erkrankungsalter wird bei Frauen mit 59,3 Jahren und Männern mit 58,7 Jahren beziffert (Preston-Martin *et al.* 1993).

Meningeome haben üblicherweise ein sporadisches Auftreten. Die Population der von multiplen Meningeomen betroffenen Patienten nimmt weniger als 2 % der Gesamtpopulation der Betroffenen ein (Zang 2001). Als Risikofaktoren für die Entwicklung eines Meningeoms gelten ionisierende Strahlung und eine chronische Infektion mit Papo- oder Adenoviren (Ron *et al.* 1988, Ibelgaufts und Jones 1982). Studienübergreifend wird das Auftreten von Meningeomen bei einem Elternteil als Prädisposition betrachtet, was eine genetische Ursache bei der Tumorgenese vermuten lässt (Sahar 1965, Memon 1980, Sedzimir *et al.* 1973)

Meningeome werden bezüglich ihrer Dignität in 3 Klassen eingeteilt, wobei bei den einzelnen Klassen mehrere morphologische Subtypen zu unterscheiden sind (Radner *et al.* 2002). Zur Differenzierung der verschiedenen Dignitäten dienen einzig histopathologische Merkmale wie Mitosenanzahl, Präsenz von Makronukleoli, Hyperzellularität, Verschalungsarchitektur, Kleinzellformation und die Präsenz einer eventuellen Hirninvasion (Radner *et al.* 2002).

Nahezu 90 % aller Meningeome werden als WHO-Grad I klassifiziert und gelten als benigne Meningeome (Zang 2001), wobei zwischen den einzelnen Subpopulationen eine große Heterogenität besteht. Trotz Rezidivierungsraten zwischen 7 % und 20 % ist der klinische Verlauf mit einer 5 Jahres-Überlebensrate von 95 % als positiv einzuschätzen. Häufigster Subtyp des benignen Meningeoms ist das meningotheiomatöse Meningeom (Perry *et al.* 1997). Obwohl per definitionem keine Hirninvasion zu befürchten ist, können benachbarte Strukturen wie Dura mater, Schädelknochen und Muskeln auch durch benigne Meningeome infiltriert werden (McCutcheon 1996).

Die Gruppe der atypischen Meningeome des WHO-Grades II nehmen einen Anteil von 5-11 % aller Meningeome ein (Pfisterer *et al.* 2004). Histopathologisches Kriterium ist dabei die Darstellbarkeit von mehr als 4 Mitosen pro 10 Gesichtsfelder bei starker Vergrößerung. Zusätzlich müssen mindestens 3 der folgenden Attribute nachweisbar sein: Eine erhöhte Zelldichte, das Vorliegen kleinzelliger Populationen, prominente Nukleoli, Architekturverlust und Nekrosen (Radner *et al.* 2002). Mit einer 5-Jahres-Rezidivierungsrate von 30- 40 % ist

ein deutlicher prognostischer Unterschied zu benignen Meningeomen festzuhalten (Pfisterer *et al.* 2004).

Das anaplastische Meningeom des WHO-Grades III stellt mit einer Rezidivierungsrate von 50- 80 % und einer mittleren Überlebenszeit von weniger als 2 Jahren den aggressivsten Subtyp der Meningeome dar (Pietsch 2002). Dieser nimmt einen Anteil von zirka 1-3 % aller Meningeome ein (Perry *et al.* 1997). Neben einer hohen mitotischen Aktivität mit mehr als 20 Mitosen je 10 Gesichtsfelder sind weitere offensichtliche Malignitätskriterien in Kombination mit einem sarkom-, karzinom- oder melanomähnlichen Erscheinungsbild histopathologisch kennzeichnend (Radner *et al.* 2002). Anaplastische Meningeome besitzen in hohem Maße die Fähigkeit zur Hirninvansion, was eine komplette chirurgische Resektion mitunter verhindert (McCutcheon 1996). Besonders bei den anaplastischen Meningeomen besteht aufgrund des sarkom- oder melanomartigen Erscheinungsbildes das Problem der histopathologischen Abgrenzung zu möglichen Differentialdiagnosen (Radner *et al.* 2002). Infolgedessen ist vermehrt der Versuch einer molekularbiologischen Charakterisierung von Meningeomen gemacht worden. Von den neuen Erkenntnissen hinsichtlich der Molekularbiologie von Meningeomen erhofft man sich neben einer genaueren Graduierung und Prognosestellung auch die Bestimmung einer spezifischen Chemosensitivität und einer entsprechenden Anpassung der Therapiestrategie.

Erste Hinweise auf den Einfluss einer genetischen Komponente bei der Entstehung von Meningeomen ließen sich in deren vermehrten Auftreten im Rahmen einer autosomal-dominanten Phakomatose, der Neurofibromatose, vermuten. Sowohl der von multiplen kutanen Fibromen gekennzeichnete Typ I, als auch besonders der mit bilateralen Akustikusneurinomen einhergehende Typ II ist mit einer Neubildung von Meningeomen vergesellschaftet (Bondy und Ligon 1996). Veränderungen des betreffenden Gens, des Neurofibromatose-2 Gens (22q12.1), sind sowohl bei allen mit Neurofibromatose II assoziierten, als auch bei 54-78% aller sporadischen Meningeome nachweisbar (Ragel und Jensen 2005). Das Neurofibromatose-2 Gen kodiert das Protein Merlin / Schwannomin, welches Teil der 4.1 Protein-Familie bzw. der Zytoskelett-assoziierten Proteine ist (Ragel und Jensen 2005). Ein Funktionsverlust des Merlin-Proteins resultiert in einer verminderten Zelladhäsion und nachfolgender Tumorgenese (Dirven *et al.* 2002, Ikeda *et al.* 1999). Somit kann das Neurofibromatose-2 Gen als ein funktionelles Tumorsuppressorgen eingestuft werden. Da sich bei atypischen und anaplastischen Meningeomen ähnliche Häufigkeitsverteilungen bei Mutationen des Neurofibromatose-2 Gens zeigen, kann ein entsprechender Funktionsverlust zwar als ein Ursprung der Tumorgenese, aber nicht als

Faktor der Tumorprogression betrachtet werden (Ragel und Jensen 2005). Trotz des häufigen Nachweises von Aberrationen des Neurofibromatose-2 Gens weisen nur zirka 33 % der betroffenen Proben einen Funktionsverlust des Gens auf (Ragel und Jensen 2005).

Weitere bei Meningeomen häufige Mutationen betreffen die Chromosomenabschnitte 1p und 14q. Diese Mutationen stehen im Gegensatz zu den Mutationen des Chromosoms 22 im Verdacht, eine Rolle in der Progression von Meningeomen zu spielen (Bello *et al.* 1994). Daneben zeigt sich ein Zusammenhang zwischen der Rezidivhäufigkeit von Meningeomen und Aberrationen der Region 1p. Während die Rezidivrate von Meningeomen mit einem nachgewiesenen Verlust der Region 1p zirka 30 % beträgt, treten Meningeome ohne nachweisbaren Verlust des Abschnitts 1p nur in 4,3 % der Fälle erneut auf (Ragel und Jensen 2005). Darüber hinaus weisen besonders anaplastische Meningeome häufig Aberrationen des Abschnitts 9p mit einem Funktionsverlust der Gene CDKN2A, p14ARF und CDKN2B auf, welche auch bei der Tumorgenese von Glioblastomen und anaplastischen Oligodendrogliomen eine Rolle spielen (Bostrom *et al.* 2001).

Studienübergreifend ist bei der Betrachtung der Häufigkeit der chromosomalen Veränderungen bei Meningeomen erkennbar, dass ein höherer Malignitätsgrad mit einer erhöhten Anzahl von chromosomalen Veränderungen einhergeht (Kim *et al.* 1998, Zang 2001, Lee *et al.* 2004). Beispiele hierfür sind zusätzliche Kopienzahlveränderungen von Abschnitten der Chromosomen 6q, 9p, 10q, 10p, 14q, und 18q bei höhergradigen Meningeomen (Collins 2004). Dabei ist die funktionelle Bedeutung der verschiedenen Kopienzahlveränderungen mitunter ungeklärt und möglicherweise auch als unspezifische Veränderung im Rahmen zunehmender genetischer Instabilität zu werten.

Neben dem Nachweis genetischer Aberrationen konnten Methylierungen der Promotorregion von Tumorsuppressorgenen bei bis zu 50 % der Meningeome nachgewiesen werden (Liu *et al.* 2005). Analog genetischer Veränderungen zeigte sich dabei ein gehäuftes Auftreten der Promotormethylierungen bei höhergradigen Meningeomen. Dabei wiesen die Promotoren der Tumorsuppressorgene GSTP1, THSB1, CDKN2A und RB1 am häufigsten Methylierungen auf (Liu *et al.* 2005).

Perspektivisch verspricht die Kartierung der verschiedenen Aberrationen zusätzliche Informationen in sowohl diagnostischer als prognostisch-therapeutischer Hinsicht.

1. 1 .2. Glioblastome

Glioblastome sind astrozytäre Tumoren neuroepithelialen Ursprungs und gehören zur Gruppe der Gliome (siehe Tabelle 1). Mit einem Anteil von zirka 20 % sind Glioblastome die häufigsten Hirntumoren (Ohgaki und Kleihues 2005). Alle bekannten Subtypen werden dem Malignitätsgrad IV zugeordnet, womit das Glioblastom zu den bösartigsten Tumoren gehört (Radner *et al.* 2002). Morphologisch charakteristisch ist das schnelle, infiltrierende Wachstum des Tumors, welcher sich nach Befall des Corpus callosum mitunter über beide Hemisphären erstrecken kann (Pietsch 2002). Eindeutige histopathologische Marker des Glioblastoms sind neben einer gesteigerten Zellproliferation das Vorkommen von Nekrosen, Thrombosen sowie mikrovaskulärer Proliferation innerhalb des Tumors (Radner *et al.* 2002).

In epidemiologischen Studien weist das Glioblastom zwei Altersgipfel auf, die eine unterschiedliche Tumorgenese vermuten lassen. So ist die Patientenpopulation des schnell wachsenden, primären Glioblastoms, welches einen Anteil von 95 % aller Glioblastome einnimmt, im Mittel 62 Jahre alt. Das mittlere Erkrankungsalter bei den sich aus diffusen oder anaplastischen Astrozytomen entwickelnden sekundären Glioblastomen liegt bei 45 Jahren (Ohgaki *et al.* 2004). Trotz Neuerungen in der neurochirurgischen und onkologischen Therapie ist die klinische Prognose bei Glioblastomen weiterhin sehr schlecht. Die mittlere Überlebensrate nach Diagnosestellung sinkt von 42,2 % nach 6 Monaten auf 17,7 % nach einem Jahr bzw. 3,3 % nach 2 Jahren, wobei das Alter des betroffenen Patienten den größten Einflussfaktor auf die mittlere Überlebenszeit darstellt. Die Spanne reicht dabei von 1,6 Monaten bei Patienten über 80 Jahren bis zu 8,8 Monaten mittlerer Überlebenszeit bei Patienten unter 50 Jahren (Ohgaki und Kleihues 2005).

Bei Untersuchungen hinsichtlich genetischer Aberrationen bei Glioblastomen konnten besonders häufig Deletionen des Chromosoms 10q (70%) sowie Amplifikationen des EGFR-Gens (36%) und Deletionen des $p16^{INK4a}$ -Gens (31%) nachgewiesen werden. Bei den sekundären Glioblastomen sind neben Mutationen des TP53 Gens (65%) ebenfalls Deletionen des Chromosomenabschnitts 10q bei einem Großteil der Tumoren (63%) nachweisbar (Ohgaki *et al.* 2004). Weitere bekannte Mutationen bei sowohl primären als auch sekundären Glioblastomen betreffen die Tumorsuppressorgene CDKN2A, CDK4, RB und PTEN. Des Weiteren sind Deletionen bei den Chromosomenabschnitten 1p, 9p, 10p, 10q, 13q, 17p, 19q und 22 nachweisbar (Schmidt *et al.* 2002).

Darüber hinaus sind Promotormethylierungen des Tumorsuppressorgens RASSF1A bei Glioblastomen bekannt (Pfeifer und Dammann 2004).

Eine eindeutige Unterscheidung zwischen primären und sekundären Glioblastomen anhand histopathologischer Merkmale ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht möglich und unterstreicht die Relevanz zusätzlicher molekularbiologischer Diagnostik (Ohgaki *et al.* 2004).

1. 1. 3. Intrakranielle Metastasen

Intrakranielle Metastasen extrakranieller Tumoren gehören mit einem Anteil von 20-30 % ebenfalls zu den häufigen Hirntumoren (Radner *et al.* 2002). Nordamerikanische Statistiken belegen, dass 20-40 % der systemischen Krebserkrankungen in ihrem Verlauf mit einer intrakraniellen Metastasierung einhergehen (Landis *et al.* 1998). In Deutschland treten jährlich zirka 8500 Neuerkrankungen auf (Steiner *et al.* 1998).

Intrakranielle Metastasen können aus unterschiedlichen Primärtumoren hervorgehen, wobei einige Primärtumoren in ihrer Häufigkeit überwiegen. So sind beispielsweise 50 % aller intrakraniellen Metastasen Tochterzellen von Bronchialkarzinomen, besonders des kleinzelligen Typs, was nicht zuletzt auf den Einfluss eines gemeinsamen embryonalen Ursprungs zurückgeführt wird (Marchetti *et al.* 2003). Ebenfalls häufig sind intrakranielle Metastasen im Rahmen eines Mammakarzinoms (15-20 %), eines malignen Melanoms (5-10 %) oder maligner gastrointestinaler Tumorerkrankungen (4-6 %) (Patchell 2003, Wen und Löffler 2000). Bei 10 % aller intrakraniellen Metastasen ist kein Primärtumor bekannt (Pietsch 2002). Im Unterschied zu Glioblastomen, welche ein diffus-infiltrierendes Wachstum aufweisen, sind metastatische Hirntumoren gewöhnlich scharf demarkiert, obgleich sie mit dem umgebenden Hirngewebe und Gefäßen interagieren. Grundsätzlich können intrakranielle Metastasen jedes Kompartiment des Zentralnervensystems befallen, wobei der Rinden-Mark-Übergang im Bereich der Hirnhemisphären eine gewisse Vorzuglokalisation darstellt. Mehr als 50 % der intrakraniellen Metastasen treten solitär auf (Pietsch 2002). Generell ist nach dem Auftreten von intrakraniellen Metastasen von einer schlechten klinischen Prognose auszugehen. In Abhängigkeit vom Alter und funktionellen Status des Patienten, der systemischen Ausbreitung der Erkrankung und der Anzahl der Metastasen beträgt die mittlere Überlebenszeit zwischen 2,3 und 13,5 Monaten (Gaspar *et al.* 2000). Unbehandelt verringert sich die mittlere Überlebenszeit auf weniger als 1 Monat (Plotkin und Wen 2003).

Untersuchungen hinsichtlich genetischer Veränderungen bei intrakraniellen Metastasen zeigen eine Assoziation zwischen der Häufigkeit der zerebralen Metastasierung und einer charakteristische Überexpression des EGFR-Gens (Torp *et al.* 1992). Eine erhöhte Potenz zur intrakraniellen Metastasierung zeigt sich auch bei Kolon-Karzinomen mit einer

CD44R1-Überexpression (Ponta *et al.* 1994) oder bei Mamma-Karzinomen mit einer S100A4 (p9Ka) (Lloyd *et al.* 1998) bzw. c-erbB2 Überexpression (Roetger *et al.* 1998). Untersuchungen hinsichtlich möglicher Kopienzahlveränderungen ergaben ein gehäuftes Auftreten von Amplifikationen der Abschnitte 1q23, 7p12, 8q24, 17q24-q25 und 20q13 sowie von Deletionen der Abschnitte 4q, 5q, 9p21, 17p12, 10q23-q24 und 18q21-q22 (Petersen *et al.* 2000).

Epigenetische Veränderungen in Form von Promotormethylierungen wurden bei hochmalignen Zellklonen eines metastatischen Lungen-Karzinoms entdeckt und erhärten die Theorie eines multimodalen genetischen Ursprungs (Inbal *et al.* 1997). So konnten in Studien Hypermethylierungen des RB1-Gens in 6 von 10 Fällen und der DAP-Kinase in 9 von 10 Fällen nachgewiesen werden (Gonzales-Gomez *et al.* 2003 und 2004). In Untersuchungen zeigten sich bei unterschiedlichen Primärtumoren Hypermethylierungen des $p16^{INK4a}$ -Gens in 83 % und des THBS-1-Gens in 56 % der Fälle (Gonzalez-Gomez *et al.* 2003).

Neben diesen Informationen bezüglich der Tumorgenese und Tumorprogression stellen molekularbiologische Untersuchungen auch neue diagnostische Erkenntnisse in Aussicht. So könnten molekularbiologische Untersuchungen bei Metastasen mit unbekannten Primarius oder schwierigen histopathologischen Differentialdiagnosen von Relevanz sein.

Zu beachten ist dabei sowohl der unterschiedliche Primarius der intrakraniellen Metastasen als auch die Unterscheidung zwischen relevanten und unspezifischen Veränderungen im Rahmen zunehmender genetischer Instabilität.

1. 2. Tumorsuppressorgene

Die Entdeckung und Isolierung der ersten Gene, welche in Zusammenhang mit der malignen Transformation von Zellen stehen, gelang über die Analyse Krebs-verursachender Viren (Payne und Kemp 2005). Diese Gene scheinen die Zellen in dominanter Art zu beeinflussen und erhielten aufgrund ihrer Fähigkeit zur Induktion der Onkogenese die Bezeichnung Onkogene (Payne und Kemp 2005). Im Vergleich dazu sind Anti-Onkogene bzw. Tumorsuppressorgene definiert als eine Genfamilie, deren Genprodukte die Zellteilung inhibieren und eine Krebs-protective Funktion besitzen. Tumorsuppressorgene kodieren dabei für unterschiedlichste Proteine diverser zellulärer Mechanismen wie Zellzyklus, Detektion und Reparatur von DNA-Schäden, Protein-Ubiquitierung und Zellspezifizierung, als auch Differenzierung, Migration und Angiogenese. Ihrem Funktionsverlust aufgrund verschiedenartiger Mutationen folgt eine fehlende Inhibition der Zellteilung mit ungebremster Vermehrung der Zelle (Sherr 2004). Im Vergleich zu Onkogenen treten Tumorsuppressorgene

allgemein rezessiv in Erscheinung und müssen für die maligne Entartung der Zelle vollständig, also homozygot, inaktiviert sein. Diese Eigenschaft wurde bereits anhand einer statistischen Auswertung der Prävalenz von unilateralen und bilateralen Retinoblastomen durch Knudson im Jahre 1971 beobachtet. Die Auswertung der Ergebnisse mündete in der Postulierung der „two-hit“-Hypothese für die Wirkung von Tumorsuppressorgenen (Knudson 1971). Diskutiert wird aber auch die Bedeutung eines heterozygoten Verlustes mehrerer Tumorsuppressorgene innerhalb eines Tumors, zeigt sich doch bei mehreren Genen eine Funktionsabhängigkeit der Genprodukte von der „Gen-Dosis“ (Payne und Kemp 2005). Das Phänomen einer pathologischen Veränderung des Phänotyps aufgrund eines heterozygoten Verlustes eines rezessiven Gens wurde bereits 1917 anhand Drosophilastudien beschrieben und mündete in dem Begriff der Haploinsuffizienz („one hit is enough“) (Bridges 1917). Bei verschiedenen Tumorsuppressorgenen konnte das Phänomen der Haploinsuffizienz nachgewiesen werden, was die Aussage über einen ausschließlich rezessiven Charakter der Tumorsuppressorgene in Frage stellt (Fero *et al.* 1998, Venkatachalam *et al.* 1998). Neben ihrer Rolle in der Genese von malignen Tumoren nehmen Tumorsuppressorgene auch eine entscheidende Rolle in der Progression von Tumoren ein (Payne und Kemp 2005).

1. 2. 1. zelluläre Funktion und Bedeutung ausgewählter Tumorsuppressorgenen

Die heute mehr als 50 bekannten Tumorsuppressorgene kodieren meist für Regulatoren der Zellteilung, DNA-Reparatur-Proteine oder Transkriptionsmodifikatoren. In den meisten Tumoren zeigt sich eine Akkumulation von Aberrationen mehrerer Tumorsuppressorgene, was auf eine Bedeutung der Gene in Tumorgenese und Progression hinweist (Poremba *et al.* 1999). Für die prototypischen Tumorsuppressorgene können drei charakteristische Eigenschaften festgehalten werden:

1. Tumorsuppressorgene verhalten sich rezessiv, d.h. für die Entstehung eines Tumors ist ein homozygoter Verlust des Gens notwendig, sei es aufgrund hereditärer oder somatischer Ursachen.
2. Die Vererbung eines Allels mit mutiertem Tumorsuppressorgen prädisponiert für die Entwicklung eines Tumors, da ein möglicher Funktionsverlust des verbliebenen Allels einen vollständigen Verlust der Krebs-protektiven Funktion bedeutet.
3. Mutationen auf Keimbahnebene können die Ursache für eine familiäre Häufung von Krebserkrankungen sein, wobei Aberrationen der entsprechenden Gene auch bei sporadischen Tumoren auftreten (Sherr 2004).

Exemplarisch folgen Erläuterungen zu den bekanntesten Tumorsuppressorgenen.

1. 2 .1. 1. p53

Das Tumorsuppressorgen TP53 ist auf der Bande 13 des Chromosoms 17p lokalisiert und kodiert für ein nukleäres Phosphoprotein, welches 53 kD groß ist (Guimares und Hainaut 2002). Mehr als 20 Jahre nach seiner Entdeckung belegen zahlreiche Untersuchungen, dass das Tumorsuppressorgen TP53 eine zentrale Rolle in den molekularen Grundlagen der Tumorgenese einnimmt. Es gilt tumorübergreifend als das am häufigsten einzeln veränderte Gen bei malignen humanen Tumoren (Olivier *et al.* 2002). Das Transkriptionsprodukt des Tumorsuppressorgens nimmt im Zellzyklus einer apathogenen Zelle die Rolle eines nukleären Transkriptionsfaktors ein, welcher als Regulator beim Übergang der Zelle von der G1-Phase in die S-Phase fungiert (Guimaraes und Hainaut 2002).

Unter apathogenen Bedingungen wird p53 in nahezu allen Gewebsarten nur gering exprimiert. Kommt es durch verschiedene Einflüsse, wie z.B. Hypoxie, zu einer vermehrten Expression und Aktivierung, werden mittels posttranskriptioneller Modifikation oder direkter Proteinbindung mehrere antiproliferative Kaskaden koordiniert (Vogelstein *et al.* 2000). Die kanzeroprotektive Bedeutung des Gens wird an mehreren Beispielen deutlich.

So sind beim Li-Fraumeni-Syndrom, welches eine familiäre Disposition für das Auftreten von multiplen, verschiedenartigen Tumoren wie Brustkrebs oder auch intrakraniellen Tumoren darstellt, häufig Keimbahn-Mutationen des TP53-Gens nachweisbar (Kleihues *et al.* 1997). Auch im Mausmodell zeigt sich bei Mäusen mit einer TP53-Mutation eine erhöhte Inzidenz von früh auftretenden, multiplen Tumoren (Mills *et al.* 1999).

Im Vergleich zu anderen Tumorsuppressorgenen handelt es sich bei über 75 % der Mutationen des TP53 um missense-Mutationen, bei denen eine einzelne Aminosäure durch eine andere substituiert ist. Unter den mehr als 15.000 bekannten Mutationen des TP53-Gens sind Veränderungen an allen 11 Exons bekannt, wobei Mutationen der Exons 4-9 dominieren (Hainaut und Hollstein 2000).

Der Funktionsverlust des Gens bedingt einen Selektionsvorteil der betroffenen Zellen und ist somit Basis für das rapide Wachstum und die Progression von malignen Tumoren (Guimaraes und Hainaut 2002). Entsprechend kann der Nachweis von Mutationen des TP53-Gens auch als Marker für die Klonalität angesehen werden. Obgleich bei vielen Tumoren eine Mutation des TP53-Gens nachweisbar ist, kann nicht davon ausgegangen werden, dass sich das Gen auf einer Region des menschlichen Genoms befindet, welche übermäßig häufig von Mutationen betroffen ist (Guimares und Hainaut 2002).

1. 2. 1. 2. CDKN2A

5 bis 12 % aller malignen Melanome treten innerhalb von Familien mit einer genetischen Prädisposition auf (Goldstein 2004). Unter dieser Population sind innerhalb Nordamerikas, Europas und Australiens wiederum 20 % von einer CDKN2A-Mutation betroffen, weshalb eine Inaktivierung dieses Gens der zentrale genetische Risikofaktor für die Entwicklung eines malignen Melanoms ist (Goldstein 2004). Des Weiteren sind Mutationen des CDKN2A-Gens auch bei Pankreas-Karzinomen und Glioblastomen gehäuft nachweisbar (Goldstein 2004).

Das CDKN2A-Gen ist auf der Bande 21 des Chromosom 9p lokalisiert und kodiert mit Hilfe eines alternativen Leserahmens und anschließendem posttranskriptionellem Splicing für 2 verschiedene Proteine (Kamb *et al.* 1994, Nobori *et al.* 1994). Das so genannte α -Transkript kodiert dabei für das Protein p16, welches die Aktivität der Cyclin-abhängigen- Kinase 4 oder 6 (CDK 4 und CDK 6) inhibiert. Diese Komplexe phosphorylieren wiederum das Retinoblastomprotein, was nunmehr den Übergang der Zelle vom G1-Stadium in das S-Stadium gewährleistet (Serrano *et al.* 1993). Durch das alternative β -Transkript wird das Protein $p14^{ARF}$ kodiert, welches mit Hilfe des p53-Proteins in der Lage ist, den Zellzyklus im G1-Stadium zu arretieren (Zhang *et al.* 1998). Somit nehmen beide Transkriptionsprodukte des CDKN2A-Gens die Funktion eines Tumorsuppressorgens ein.

1. 2. 1. 3. RB

Durch statistische Analyse der Verteilung des Erkrankungsalters bei Retinoblastom-Patienten mit oder ohne familiäre Prädisposition gelangte Alfred Knudson in den Jahren 1971 und 1973 zu der Hypothese, dass zwei Mutationen zur Ausbildung eines Retinoblastoms notwendig sind („two-hit“-Hypothese). Dabei spreche ein frühes und beidseitiges Auftreten des Tumors für eine Mutation auf der Ebene der Keimbahn (Knudson 1971). Ein genetischer Nachweis gelang mit Hilfe von Banden-Färbungen im Jahre 1976, wobei eine Deletion der Region 13q14 nachgewiesen werden konnte (Knudson *et al.* 1976). Die Klonierung des entsprechenden Gen-Abschnitts erfolgte durch Friend *et al.* (Friend *et al.* 1986).

Das Retinoblastom-Gen bildet mit den Genen p107 und p130 eine Gen-Familie, die gemeinsam Programme der Zellzyklus-Progression, Apoptose und Differenzierung kontrollieren. Dabei ist besonders innerhalb der G1-Phase des Zellzyklusses eine erhöhte Aktivität der Gen-Familie erkennbar (Sherr 2004). Das Genprodukt interagiert mit bestimmten Transkriptionsfaktoren, von denen jene mit dem Transkriptionsfaktor E2F am besten charakterisiert ist. Der Transkriptionsfaktor E2F wiederum kontrolliert u. a. den Metabolismus der DNA. Seine Expression ist notwendig, um Zellen zu befähigen, die

S-Phase des Zellzyklusses zu erreichen (Nevins 2001, Trimarchi und Lees 2002). Durch Bindung an E2F-Rezeptoren verhindern die Proteine der Retinoblastom-Familie durch Aktivierung von Histon-Deacetylasen und Chromatin-Remodelling-Faktoren die Expression der notwendigen Loci (Harbour und Dean 2000). Durch eine Phosphorylierung der Proteine der Retinoblastom-Familie durch mitogen-aktivierte Cyclin-abhängige Kinasen kann dieser Mechanismus unterdrückt werden und ein Übergang der Zellen in die S-Phase gewährleistet werden (Weinberg 1995).

Da der funktionelle Ausfall dieser Kaskade einen Verlust der Zellzykluskontrolle nach sich zieht, nimmt das Retinoblastom-Gen die Rolle eines klassischen Tumorsuppressorgens ein.

1. 2. 1. 4. BRCA1 und BRCA2

Bei zirka 5 % aller Mamma-Karzinome zeigt sich eine familiäre Häufung, der ein autosomal-dominanter Erbgang mit unvollständiger Penetranz zugrunde liegt (Rosen *et al.* 2003). Als genotypisches Korrelat wurde zunächst eine Deletion des Chromosoms 17q identifiziert (Hall *et al.* 1990). Das von der Deletion betroffene Gen, BRCA1, konnte 1994 identifiziert werden, wobei sich allerdings eine Mutation des Gens bei hereditären Formen nur in 45 % der Tumoren Häufung nachweisen ließ (Smith *et al.* 1992, Neuhausen und Marshall 1994). Die daraufhin geäußerte Vermutung eines weiteren, für die Entwicklung eines Mamma-Karzinoms verantwortlichen Gens bestätigte sich 1995 mit der Entdeckung des Tumorsuppressorgens BRCA2 auf dem Abschnitt 13q12.3 (Wooster *et al.* 1994 und 1995). Neben einem gehäuften Funktionsverlust der Gene bei hereditären Formen des Ovarial- und Mammakarzinoms sind Mutationen auch bei Karzinomen des Pankreas und der Prostata nachweisbar (Rahmann und Stratton 1998).

Die von den beiden Genen jeweils synthetisierten Proteine erfüllen verschiedene Aufgaben innerhalb der DNA-Reparatur-Mechanismen. Weitere Funktionen sind die transkriptionelle Antwort auf eine DNA-Schädigung sowie die Kontrolle des Zellzyklus (Yoshida und Miki 2004). Diese Funktionen erklären den mit dem Funktionsverlust der Gene assoziierten Phänotyp und klassifizieren beide Gene als Tumorsuppresogene.

Da bei sporadischen Formen des Mamma-Karzinoms nur selten Mutationen des BRCA1 oder BRCA-2-Gens nachgewiesen werden können, besitzt die Erfassung hereditärer Formen einen hohen Stellenwert und findet bereits Anwendung in der prophylaktischen Chirurgie.

1. 2. 2. Inaktivierungsmechanismen

Der Funktionsverlust von Tumorsuppressorgen ist eine der genetischen Ursachen für die Entwicklung von malignen Tumoren (Sherr 2004). Entsprechend der bereits erwähnten „two-hit“-Hypothese ist ein Effekt in der Regel an die Inaktivierung beider Allele gebunden (Knudson 1971). Laut Vogelstein und Kinzler sind je nach Tumorentität zwischen 2 und 7 spezifischen Änderungen des Genoms notwendig, um eine maligne Transformation zu induzieren, welche letztendlich in einem klinisch manifesten Tumor resultiert (Vogelstein und Kinzler 1993). Neben der Entstehung von malignen Tumoren ist auch die Progression von malignen Neoplasien durch eine Akkumulation von multiplen genetischen Alterationen gekennzeichnet (Zheng *et al.* 2005). Verschiedene Mechanismen können dieser Inaktivierung zu Grunde liegen, wobei genetische und epigenetische Veränderungen unterschieden werden.

1. 2. 2. 1. Punktmutationen

Als Punktmutation wird die Veränderungen einer einzelnen oder weniger Basen innerhalb der DNS verstanden, wobei es zwischen unterschiedlichen Mechanismen zu unterscheiden gilt.

Eine Möglichkeit besteht in dem Ersatz einer Base durch eine andere, ursprünglich nicht an dieser Position gesetzten Base, was als Substitution bezeichnet wird. Als Ergebnis einer Substitution kann sowohl eine sinnverändernde, so genannte „*missense*“-Mutation als auch eine sinnentstellende, so genannte „*nonsense*“-Mutation resultieren, bei der durch den Austausch einer einzelnen Base ein Stop-Codon entsteht, welches eine weitere Translation des Proteins inhibiert.

Neben der Substitution können Punktmutationen auch durch Deletionen oder Insertionen erfolgen. Dabei kennzeichnet der Begriff der Deletion im Rahmen von Punktmutationen den Verlust einer oder weniger Basen, während es bei der Insertion zu einer zusätzlichen Einfügung einer oder weniger Basen innerhalb des DNS-Stranges kommt. Durch die numerische Veränderung der Basen kommt es zusätzlich zu einer Verschiebung des Leserasters, wodurch eine regelrechte Transkription nicht mehr gewährleistet werden kann. Das nach links oder rechts verschobene Leseraster bedingt somit die Synthese eines völlig anders strukturierten Proteins, welches seiner ursprünglichen Funktion nicht mehr gerecht werden kann.

1. 2. 2. 2. Deletionen

Neben Punktmutationen stellen Deletionen einen weiteren Inaktivierungsmechanismus von Genen dar. Dabei bezeichnet der Begriff der Deletion unabhängig von der Ursache einen Verlust vieler Nukleotide, ganzer Genabschnitte oder sogar mehrerer Gene. Solch ein Verlust ist häufig Folge von Doppelstrangbrüchen der DNS. Ursachen der Doppelstrangbrüche sind neben ionisierender Strahlung auch die Wirkung freier Radikale als Produkte des oxidativen Stoffwechsels. Darüber hinaus treten Doppelstrangbrüche auch spontan im Rahmen der DNS-Replikation auf (Pastwa und Blasiak 2003). Doppelstrangbrüche vermindern die genomische Stabilität und können Ursache für Mutationen, maligne Entartung oder Zelltod sein (Iliakis *et al.* 2004). Für die Korrektur bzw. Reparatur der Doppelstrangbrüche existieren verschiedene zelluläre Mechanismen. Bei der homologen direkten Reparatur (HDR) werden fehlende Nukleotide sequenzgetreu ersetzt. Im Gegensatz dazu werden bei dem Prozess des *non-homologous-end-joining* (NHEJ) die entstandenen DNS-Enden ohne Wiederherstellung der Ursprungssequenz miteinander verbunden (Iliakis *et al.* 2004). Darüber hinaus kann es nach Doppelstrangbrüchen zwischen ähnlichen, meist repetitiven Sequenzen zu einer Rekombination kommen, was als *non-allelic-homologous-recombination* (NAHR) bezeichnet wird (Lupski 2004). Unzureichend oder falsch reparierte Sequenzen von Tumorsuppressorgenen können zu einer malignen Entartung der betroffenen Zelle führen (Pastwa und Blasiak 2003). Entsprechend häufig sind maligne neoplastische Erkrankungen mit Inversionen, Translokationen und großen Deletionen assoziiert, die Folge von Doppelstrangbrüchen sein können (Lengauer *et al.* 1998).

1. 2. 2. 3. Amplifikationen

Neben Punktmutationen und Deletionen tragen auch Amplifikationen zur genetischen Instabilität maligner Tumorzellen bei (Schwab 1999). Verschiedene Mechanismen können dabei Ursache der Vervielfältigung einzelner chromosomaler Abschnitte sein. Häufig sind Amplifikationen mit der Formation sogenannter *double-minute*-Chromosomen assoziiert (Brison 1993, Hahn 1993). Darüber hinaus sind Amplifikationen auch das Resultat von Strangbrüchen mit anschließender Hybridisierung und Brückenbildung (McClintock 1941). Dabei führt die verminderte Stabilität der Telomere in Tumorzellen häufig zu einer fehlerhaften Fusion von DNS-Bruchstücken (Lo *et al.* 2002). Neben unspezifischen Amplifikationen nimmt vor allem die Kopienzahlvervielfältigung und resultierende Überexpression von Onkogenen eine große Rolle in der Entstehung und Progression maligner Tumoren ein (Brison 1993).

Beispielhaft ist eine Überexpression infolge Genamplifikation des ERB2-Gens, die bei Karzinomen der Mamma, des Magens oder des Ovars häufig nachweisbar ist (Poremba *et al.* 1999).

1. 2. 2 .3. Promotormethylierungen

Ein weiterer Inaktivierungsmechanismus von Genen ist das Phänomen der Methylierung, welche sowohl an Promotorregionen, als auch an weiteren Genabschnitten erfolgen kann.

Im Vergleich zu Punktmutationen, Insertionen oder Deletionen resultiert eine Methylierung trotz Weitergabe bei der Zellteilung nicht in einer Veränderung der ursprünglichen Nukleotidsequenz. Entsprechend werden Methylierungen, als epigenetische Veränderungen bezeichnet (Bird 2002, Jones und Baylin 2002).

Die Methylierung der DNS tritt durch kovalente Bindung von Methylgruppen am 5. Kohlenstoffatom des Cytosin-Rings auf (Bird 2002). Die Methylierung wird von DNS-Methyltransferasen katalysiert, deren Expression bei verschiedenen malignen Tumoren signifikant erhöht ist (Luczak und Jagodzinski 2006). Das resultierende 5-Methylcytosin befindet sich hauptsächlich an Cytosin-Guanin-Dinukleotiden, welche wiederum besonders häufig in Nähe der Transkriptions-induzierenden Promotoren lokalisiert sind und sogenannte CpG-Inseln bilden. (Herman und Baylin 2003). Diese CpG-Inseln sind bei apathogenen somatischen Zellen üblicherweise unmethyliert, um eine Genexpression zu gewährleisten, während eine Methylierung vor allem in nicht-kodierenden DNS-Regionen eine Transkription verhindert (Bird 2002). Diese Blockierung der Transkription gewährleistet eine hohe genetische Stabilität.

Des Weiteren spielen Methylierungen eine entscheidende Rolle bei der Inaktivierung von Genen der X-Chromosomen bei Frauen (*Imprinting*), wodurch nur das väterliche oder das mütterliche Gen exprimiert wird (Bird 2002, Herman und Baylin 2003).

Eine Methylierung von Tumorsuppressorgenen als epigenetische Veränderung resultiert ebenso in einem heterozygoten Funktionsverlust des Gens wie genetische Mutationen. Entsprechend der bereits erwähnten „*two-hit*“-Hypothese verursacht die Methylierung eines Tumorsuppressorgens zusammen mit einer Aberration des zweiten Allels die vollständige biallele Inaktivierung.

Die Häufigkeit von Methylierungen bei Tumoren wird studienübergreifend auf dem Niveau genetischer Mutationen vermutet, wobei eine Rolle sowohl in der Tumorentstehung als auch der Tumorprogression bei der Vielzahl der betroffenen Gene wahrscheinlich ist

(Baylin 2005). Methylierungen sind besonders häufig in Tumorzellen nachweisbar, wobei durch Methylierung von Promotorregionen ein Funktionsverlust der betroffenen Tumorsuppressorgene resultiert (Jones und Baylin 2002, Herman und Baylin 2003).

1. 2. 3. Bedeutung der Erfassung inaktivierter Tumorsuppressorgene

Die traditionelle Beschreibung von Tumoren beschränkt sich meist auf das makroskopische und histopathologische Erscheinungsbild, fakultativ kombiniert mit immun- oder enzymhistochemischen Verfahren. Die daraus erhaltenen Kenntnisse haben einen deskriptiven und klassifizierenden Charakter und geben teilweise auch einen Hinweis auf das biologische Verhalten (Malignität) des Tumors. Kenntnisse über Mutationen einzelner Tumorsuppressorgene vervollständigen zunehmend die Charakterisierung und Differenzierung der verschiedenen Tumoren und geben darüber hinaus Informationen über den Malignitäts- und Progressionsgrad (Zheng *et al.* 2005). Neue Erkenntnisse hinsichtlich der Tumorbiologie erhofft man sich aus der Charakterisierung von Tumoren auf molekularer Ebene, nicht zuletzt um neue therapeutische Ansätze zu entdecken und eine zunehmende Individualisierung in der Behandlung zu ermöglichen (Ramaswamy und Golub 2002). Der Inaktivierungsstatus von Tumorsuppressorgenen könnte in dieser Hinsicht als molekularer Marker für die Diagnose und Prognose von Bedeutung sein, Hinweise über die Chemosensitivität liefern und zum näheren Verständnis der Tumorbiologie beitragen. Beispielhaft erlauben detektierte Duplikationen und Deletionen der Tumorsuppressorgene BRCA1 oder MLH1/MSH2 eine Aussage hinsichtlich einer Prädisposition zur Entwicklung von Mamma- bzw. Kolonkarzinomen (Petrij-Bosch *et al.* 1997, Wijnen *et al.* 1998). Die Bedeutung von Tumorsuppressorgenen für die Entstehung von Tumoren beruht auf der Diversität der verschiedenen Einflüsse. Im Gegensatz zu Protoonkogenen bzw. Onkogenen, welche meist in dieselben funktionellen Prozesse involviert sind, besitzen Tumorsuppressorgene eine Krebs-protective Funktion (Poremba *et al.* 1999). Kenntnisse über den kombinierten Inaktivierungsstatus von Tumorsuppressorgenen könnten somit auch zu einem besseren Verständnis tumorrelevanter Prozesse beitragen.

1. 3. Methoden zur Erfassung von Aberrationen

1. 3. 1. Herkömmliche Methoden

1. 3. 1. 1. Karyotypisierung

Die als Karyotypisierung bekannte Färbung von Metaphase-Chromosomen nach Giemsa stellt das älteste Verfahren zur Untersuchung der chromosomalen Integrität dar. Sie ist relativ unsensitiv, da sie nur den Nachweis von Deletionen bzw. Amplifikationen großer genomischer Abschnitte ermöglicht (Gray und Collins 2000). Die Giemsa Färbung eignet sich besonders bei Leukämien und Lymphomen zur Detektion von chromosomalen Aberrationen (Rowley 1998). Im Gegensatz dazu ist sie aufgrund der schwierigen Präparation von Metaphase-Chromosomen bei der Untersuchung von soliden Tumoren ungeeignet. Zusätzlich erschwert die Vielzahl der strukturellen Veränderungen die Interpretation des Karyotyps bei soliden Tumoren (Gray und Collins 2000).

1. 3. 1. 2. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Im Vergleich zur unspezifischen Bandenfärbung erlaubt die spezifische Bindung von Markern an Metaphase-Chromosomen bei der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) eine genauere Analyse struktureller Aberrationen (Gray und Collins 2000). Die Verwendung von markierten Oligonukleotiden bedingt im Vergleich zur unspezifischen Bandenfärbung eine Vorauswahl der zu untersuchenden Loci. Dabei besteht durch die Verwendung verschiedener Markierungen die Möglichkeit einer simultanen Untersuchung einer Vielzahl spezifischer Loci (Fleischman *et al.* 1999). Trotz der höheren Spezifität ist die Anwendung der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung bei soliden Tumoren erneut aufgrund der schwierigen Interpretation der komplexen Veränderungen des Karyotyps limitiert. Zusätzlich besteht eine Abhängigkeit der Methode von der Verfügbarkeit von Metaphasechromosomen, die eine Anwendung bei Tumoren mit geringerer Proliferationsrate einschränkt (Teixeira 2002).

1. 3. 1. 3. Vergleichende Genomhybridisierung

Besonders bei der Untersuchung chromosomaler Aberrationen solider Tumoren bietet die vergleichende genomische Hybridisierung (*comparative genomic hybridisation* = CGH) den Vorteil einer direkten Untersuchung von Tumorgewebe ohne aufwendige Isolation von Metaphase-Chromosomen oder Anzüchtung spezifischer Zelllinien (Weiss *et al.* 1999). Bei dieser Methode wird Tumor-DNS mit einem grünen, fluoreszierenden Farbstoff markiert und mit normaler DNS, welche mit einem roten, fluoreszierenden Farbstoff versehen ist, im Verhältnis 1:1 gemischt. Nach Zugabe einer Referenz-DNS konkurrieren beide markierte

DNS-Stränge um die Bindung am komplementären DNS-Strang (Kallioniemi *et al.* 1994). Die Rot- oder Grünverschiebung des Misch-Fluoreszenz-Signals ermöglicht anschließend die genom-weite Detektion von Kopienzahlveränderungen. Allerdings können mittels vergleichender genomischer Hybridisierung strukturelle Veränderungen, wie Inversionen oder balancierte Translokationen nicht detektiert werden. Für den Nachweis einer Kopienzahlveränderung mittels CGH beträgt die Sensitivitätsschwelle zwischen 10 und 20 Mb und ist somit gegenüber PCR-basierten Methoden geringer (Weiss *et al.* 1999).

1. 3. 1. 4. Mikrosatelliten-basierter Nachweis von Heterozygositätsverlusten

Nicht-kodierende, hochrepetitive Sequenzen werden ebenfalls für den Nachweis von Deletionen verwendet. Diese Sequenzen, so genannte Mikrosatelliten, kommen in unterschiedlicher Länge vor. Entsprechend sind in einem Individuum oft zwei verschiedene Allele anzutreffen (Heterozygotität). Die wiederkehrenden Sequenzen ermöglichen den Einsatz von Universal-Primern bei einer Amplifizierung mittels PCR. Ein Verlust von chromosomalen Abschnitten wird anhand des Verlustes der Heterozygotität (*loss of heterozygosity* = LOH) der repetitiven Sequenzen detektiert.

Vorteil des PCR-basierten Verfahrens ist eine höhere Spezifität, die im Vergleich zur vergleichenden genomischen Hybridisierung (CGH) die Detektion kleinerer chromosomaler Veränderungen erlaubt. Dabei muss allerdings auch eine Vorauswahl der verschiedenen Loci getroffen werden. Ein entscheidender Nachteil ist die Notwendigkeit einer „gesunden“ Referenz DNS vom selben Patienten (Tomlinson *et al.* 2002).

Auf die genannten Methoden trifft daher für die Untersuchung von veränderten Tumorsuppressorgenen mindestens einer der folgenden Nachteile zu:

1. geringe Sensitivität
2. keine direkte Untersuchung von Tumormaterial möglich
3. Notwendigkeit einer Vergleichs-DNS aus peripheren Blutzellen
4. kein Nachweis von Methylierungen
5. hoher technischer Aufwand

1. 3. 2. Multiplex ligation-dependent probe amplification

1. 3. 2. 1. Prinzip des MLPA-Verfahrens

Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) ermöglicht eine relative Quantifizierung von bis zu 50 verschiedenen DNS-Sequenzen in einem Arbeitsschritt und erlaubt somit einen Rückschluss auf Veränderungen der Kopienanzahl verschiedener Gene (Schouten *et al.* 2002). Mit einer Modifikation der Methode lässt sich darüber hinaus auch der Methylierungsstatus der untersuchten Abschnitte ermitteln. Beide Verfahren seien im Folgenden näher erläutert.

Bei dem MLPA-Verfahren kommen sogenannte Probes zur Anwendung, welche in Abhängigkeit vom Status des zu untersuchenden Tumorsuppressorgens amplifiziert werden. Jede dieser MLPA-Proben besteht aus einem kurzem synthetischem und einem langen, durch M13-Phagen synthetisiertem Oligonukleotid. Das kurze, synthetische Oligonukleotid trägt am 3'-Ende die Zielsequenz und am 5'-Ende eine universelle Sequenz zur späteren Amplifizierung der Probe. Das lange Oligonukleotid trägt an seinem 5'-Ende eine Zielsequenz, welche sich direkt neben der Bindungsstelle des kurzen Oligonukleotids an der DNS anlagert. Neben der Bindungsstelle für die PCR-Amplifikation am 3'-Ende zeichnet sich das lange Oligonukleotid noch durch eine Füllsequenz mit einer Größe von 19 bis 370 Nukleotiden zwischen dem 3' und 5'-Ende aus, die eine Größendivergenz der verschiedenen PCR-Produkte bedingt und somit deren elektrophoretische Auftrennung ermöglicht.

Wie in der nachfolgenden Abbildung 1 erkennbar, erfolgt nach Bindung und Hybridisierung der beiden Oligonukleotide an ihrer Zielsequenz die Ligation der beiden Enden. Da alle ligierten Proben identische Sequenzen an ihren 5' und 3'-Enden tragen, ist anschließend eine simultane Amplifikation durch ein einzelnes Primer-Paar möglich. Die entstehenden PCR-Produkte besitzen eine Größe zwischen 130 und 480 Basenpaaren mit einer jeweiligen Längendifferenz zwischen 6 bis 9 Basenpaaren.

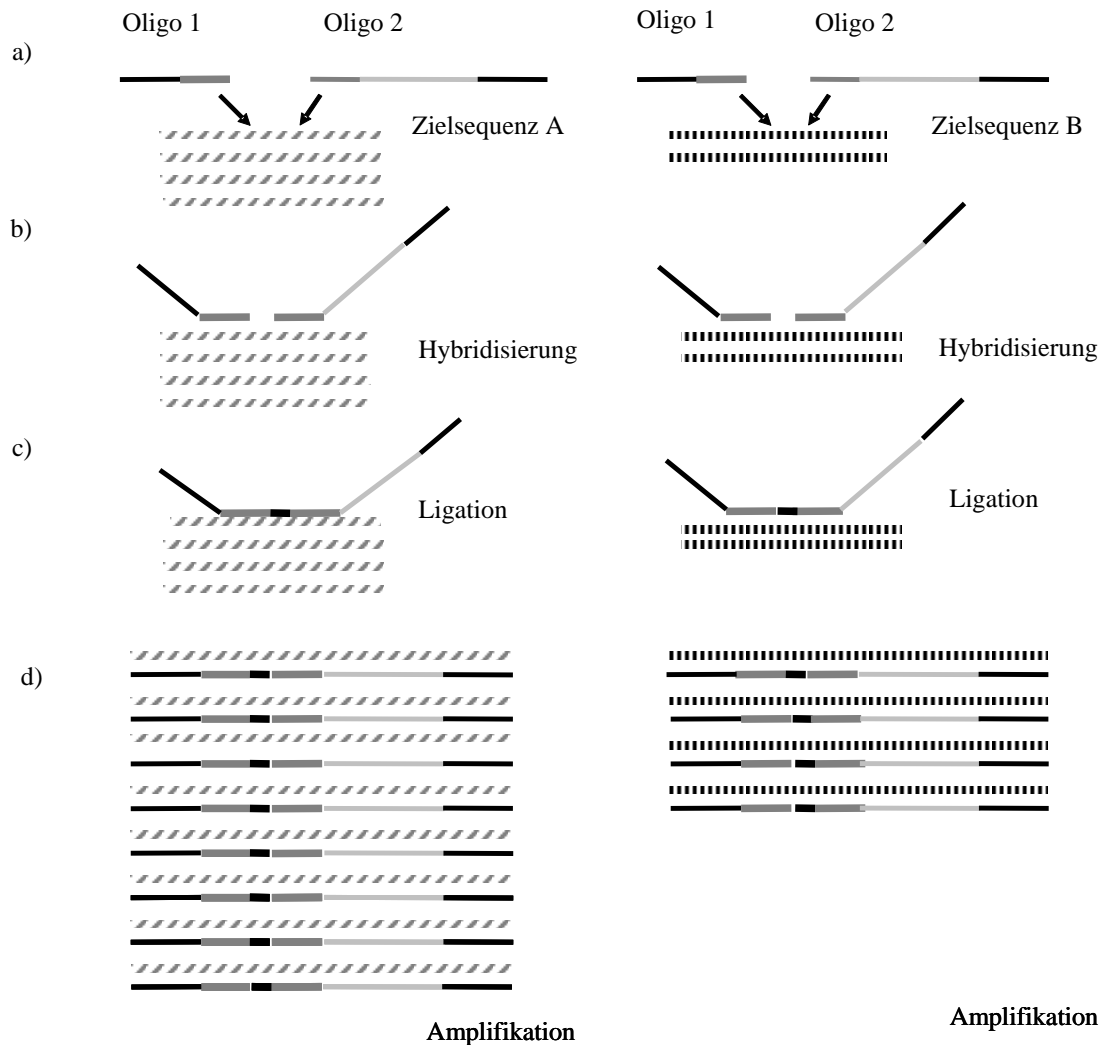


Abbildung 1 : schematische Darstellung des MLPA-Verfahrens

- Bindung der beiden sequenzspezischen Oligonukleotide (MLPA-Proben) an den Zielsequenzen; Darstellung einer Deletion bei Zielsequenz B
- Hybridisierung der MLPA-Proben mit Proben-DNS
- Ligation der MLPA-Proben
- Amplifikation der Probes in Abhängigkeit der Kopienzahl der Zielsequenz; Zielsequenz B wird aufgrund geringerer Kopienzahl weniger amplifiziert.

Die entstehenden PCR-Produkte werden durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und ihre Bandenstärke densitometrisch ausgewertet. Eine Aussage hinsichtlich der Kopienzahl der einzelnen Zielsequenzen anhand der Bandenstärke kann erst nach Normalisierung der Signalintensitäten erfolgen, da sich das relative Signal zwischen den einzelnen Amplifikationsprodukten unterscheidet (Schouten *et al.* 2007). Mit Hilfe der erhältlichen Probe-Mixe können somit zwischen 35 und 42 Zielsequenzen amplifiziert und aufgetragen werden. Vorteilhaft ist neben der hohen Anzahl der Zielsequenzen, die in einem Arbeitsschritt untersucht werden können, auch die geringe Größe der Oligonukleotide. Dadurch wird eine genauere Mutationsanalyse, z.B. einzelner Exons, auch von benachbarten Zielsequenzen ermöglicht, ohne dass überlappende Oligonukleotide um die Zielsequenzen konkurrieren (Schouten *et al.* 2002).

Das MLPA-Verfahren erlaubt die direkte Untersuchung von Tumorgewebe. Für die simultane Untersuchung der verschiedenen Loci werden pro Versuchsanordnung und Tumorseite nur 25 ng DNS benötigt, was je nach Gewebeart einer Probenmenge zwischen 10 und 25 mg entspricht. Für den Nachweis genetischer und epigenetischer Veränderungen in Tumoren ist dabei nur ein Anteil von 50 % Tumor-DNS notwendig (Jeuken *et al.* 2006).

Entsprechend dem Studiendesign können mit Hilfe verschiedener MLPA-Proben unterschiedlichste Fragestellungen bearbeitet werden. Dabei können sich alle verwendeten MLPA-Proben auch nur gegen einzelne Exons richten. Erfolgreiche Anwendung fand das MLPA-Verfahren neben der Tumor-Genetik auch in der Detektion von telomeren Inbalancen bei mentaler Retardierung und dem Nachweis von Trisomien (Ahn *et al.* 2007)

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die MLPA-Reaktion im Vergleich zu herkömmlichen Methoden schnell, relativ kostengünstig und mit der üblichen Ausstattung eines molekularbiologischen Labors einfach durchzuführen ist und für die hier angestrebten Untersuchungen gut geeignet ist.

1. 3. 2. 2. Prinzip des MS-MLPA-Verfahrens

Neben dem Nachweis von Deletionen oder Amplifikationen von Genen können mit Hilfe des MLPA-Verfahrens in einem gesonderten Reaktionsschritt Methylierungen von Zielsequenzen erfasst werden. Das *methylation-specific* (MS)-MLPA-Verfahren beruht dabei auf der Kombination aus Ligation der Probes und einem möglichem Verdau des DNS-Probe-Hybrids durch eine Methylgruppen-sensitive Endonuklease. Nach Zugabe der Endonuklease kommt es nur zu einem Verdau der nicht-methylierten Hybride. Die Methylierung der untersuchten Abschnitte wird folglich durch einer zusätzlichen Signalbande in der anschließenden

Gelelektrophorese nachgewiesen. Im Gegensatz zur densitometrischen Auswertung des Signals bei der Betrachtung möglicher Kopienzahlveränderungen kann anhand des Vorhandenseins oder Fehlens einer Signalbande eine binäre Entscheidung über den Methylierungsstatus getroffen werden. Bei den hier untersuchten Tumorsuppressorgenen wurden ausschließlich Methylierungen der Promotorregion untersucht.

2. Zielstellung

Die vorliegende Arbeit verfolgt folgende Zielstellungen:

- Erfassung von Kopienzahlveränderungen und Promotormethylierungen von Tumorsuppressorgen bei intrakraniellen Tumoren mit Hilfe des MS-MLPA-Verfahrens.
- Vergleich der erhobenen Daten mit Ergebnissen methodisch differierender Studien.
- Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Anzahl der detektierten Aberrationen und Malignitätsgrad.

3. Material und Methoden

3. 1. Statistische Angaben der untersuchten Tumorproben

Die vorliegenden Untersuchungen wurden an Tumorproben durchgeführt, welche im Rahmen eines Gemeinschaftsprojekts zwischen dem Institut für klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik und der Klinik für Neurochirurgie der Friedrich-Schiller-Universität Jena gesammelt wurden. Nach einer operativen Resektion der Tumoren durch die Klinik für Neurochirurgie erfolgte eine Lagerung des hier verwendeten Tumoranteils bei -80° Celsius.

Um die Personenschutzrechte der betroffenen Patienten zu wahren, wurden die Proben anonymisiert. Insgesamt standen 29 Tumoren für die Untersuchungen zur Verfügung, darunter 15 Meningeome (10 x Grad I, 3 x Grad II und 2 x Grad III), 7 Gliome (6 Glioblastome, 1 Astrozytom Grad III) sowie 7 intrakranielle Metastasen. Ursprung der Metastasen waren dabei Karzinome der Mamma (2x) und des Rektums (1x), sowie das maligne Melanom (2x) und das Nierenzellkarzinom (1x). Bei einer Metastase konnte zu Beginn der Untersuchungen klinisch noch kein Primarius gesichert werden.

Das Durchschnittsalter der Patienten mit einem Meningeom beträgt 61,1 Jahre (Min = 32 Jahre, Max = 81 Jahre, Median = 66 Jahre), wobei 68,7 % (11 von 15) der betroffenen Patienten weiblichen Geschlechts sind.

51,4 Jahre (Min = 42 Jahre, Max = 67 Jahre, Median = 42 Jahre) beträgt das Durchschnittsalter der Patienten mit einem Gliom. In dieser Population stellt das männliche Geschlecht mit 71,4 % (5 von 7) den größeren Anteil dar.

Bei Patienten, die von einer intrakraniellen Metastase betroffen sind, beträgt das durchschnittliche Alter innerhalb der Tumorproben 64 Jahre (Min = 53 Jahre, Max = 76 Jahre, Median = 64 Jahre). 42,8 % (3 von 7) der Tumorproben sind männlichen Ursprungs. 57,1 % (4 von 7) der intrakraniellen Metastasen stammen von weiblichen Patienten.

Das Gesamtdurchschnittsalter aller Patienten beträgt 59,4 Jahre (Min = 32 Jahre, Max = 81 Jahre, Median = 62). Frauen stellen mit 58,6 % (17 von 29) aller Tumorproben gegenüber 41,3 % (12 auf 29) bei den Männern den größeren Anteil der Patientenpopulation.

Tumorentität	Alter	Geschlecht	Kodierung
Meningeom Grad I	49	weiblich	MI-1
Meningeom Grad I	77	weiblich	MI-2
Meningeom Grad I	42	weiblich	MI-3
Meningeom Grad I	78	weiblich	MI-4
Meningeom Grad I	66	weiblich	MI-5
Meningeom Grad I	69	weiblich	MI-6
Meningeom Grad I	43	weiblich	MI-7
Meningeom Grad I	70	weiblich	MI-8
Meningeom Grad I	61	männlich	MI-9
Meningeom Grad I	71	männlich	MI-10
Meningeom Grad II	48	weiblich	MII-1
Meningeom Grad II	51	weiblich	MII-2
Meningeom Grad II	81	männlich	MII-3
Meningeom Grad III	32	weiblich	MIII-1
Meningeom Grad III	78	weiblich	MIII-2
Glioblastom	60	weiblich	G-1
Glioblastom	42	weiblich	G-2
Glioblastom	42	männlich	G-3
Glioblastom	67	männlich	G-4
Glioblastom	65	männlich	G-5
Glioblastom	42	männlich	G-6
Astrozytom Grad III	42	männlich	G-7
Metastase (kein Primarius)	53	weiblich	MTS-1
Metastase (Rektum-Ca)	64	weiblich	MTS-2
Metastase (Mamma-Ca)	73	weiblich	MTS-3
Metastase (Mamma-Ca)	62	weiblich	MTS-4
Metastase (Nierenzell-Ca)	76	männlich	MTS-5
Metastase (malignes Melanom)	64	männlich	MTS-6
Metastase (malignes Melanom)	56	männlich	MTS-7

Tabelle 2. Statistische Angaben und Kodierung der verwendeten Tumorproben

3. 2. Aufarbeitung der Tumorproben

Nach Anonymisierung wurden die einzelnen Proben gewogen. Das Ausgangsgewicht der Proben divergierte dabei zwischen 2,29 g und 66 mg. Um das zur Lyse der DNS empfohlene Gewicht von 25 mg zu gewährleisten, wurden die Proben anschließend in kleinere Einzelstücke zerteilt.

Für eine Einschätzung des Tumoranteils innerhalb der zur Verfügung gestellten Proben wurden histologische Dauerpräparate der einzelnen Tumoren in Hämatoxylin-Eosin-Färbung mit einer Schichtdicke zwischen 10 und 12 Mikrometern angefertigt. Die Färbung erfolgte nach dem Protokoll nach Ehrlich und gliederte sich in folgende Arbeitsschritte:

1. Färbung in Hämatoxylin Ehrlich	(10 min)
2. Auswaschen	(5 min)
3. Differenzierung in HCl-Alkohol	(1 sek)
4. Auswaschen	(5 min)
5. Ammoniakalisches Bläuen	(1 sek)
6. Auswaschen	(10-20 min)
7. Zytoplasmafärbung in Eosin	(2 min)

Für die molekularbiologischen Untersuchungen wurden nur die Tumorproben verwendet, welche in der erneuten, anschließenden histopathologischen Untersuchung den empfohlenen Tumoranteil von mindestens 50 % aufwiesen.

Zur Isolierung der für die Untersuchungen notwendigen DNS aus den Tumorproben wurde das Dneasy Tissue Mini Kit der Firma Qiagen benutzt. Die Extraktion genomischer DNS erfolgte nach Standardprozeduren bzw. den Herstellerempfehlungen.

3. 3. Untersuchte Tumorsuppressorgene

Die zur Verfügung gestellten Hirntumoren wurden hinsichtlich Kopienzahlveränderungen und Methylierungen der Promoterregionen von Tumorsuppressorgenen mit Hilfe von zwei Kits der Firma MRC Holland untersucht. Beide Kits enthalten jeweils 41 Oligonukleotide (MLPA-Proben) die sich gegen die Promotoren verschiedener Tumorsuppressorgene richten. Dabei werden vereinzelt Tumorsuppressorgene auch durch 2 oder sogar 3 Oligonukleotide untersucht, welche komplementär zu unterschiedlichen Sequenzen des Promoters eines Tumorsuppressorgens sind. Die nachfolgenden tabellarischen Auflistungen (Tabelle 3 und Tabelle 4) geben einen Überblick über die untersuchten Tumorsuppressorgene und

kennzeichnen weiterhin, welche Tumorsuppressorgene auch hinsichtlich ihres Methylierungsstatus untersucht werden können. Aufgrund der Bindungsspezifität der Methylgruppen-sensitiven Endonuklease können bei jeweils 15 Tumorsuppressorgen pro Kit keine Promotormethylierungen nachgewiesen werden.

Gen	chromosomaler Locus	Gen	chromosomaler Locus
TP73*	01p36	CD44*	11p13
CASP8*	02q33-q34	GSTP1*	11q13
FHIT*	03p14.2	ATM*	11q22.3
MLH1*	03p21.3	IGSF4*	11q23
MLH1*	03p21.3	TNFRSF1A	12p13
RASSF1*	03p21.3	TNFRSF7	12p13
RASSF1*	03p21.3	CDKN1B*	12p13.1
CTNNB1	03p22	PAH	12q23
RARB*	03p24	CHFR *	12q24.33
VHL*	03p26-p25	BRCA2*	13q12
CASR	03q21	BRCA2	13q12.3
APC *	05q21	MLH3	14q24.3
ESR1*	06q25.1	TSC2	16p13.3
PARK2	06q25.2-q27	CDH1	16q22.1
CDK6	07q21.3	CDH13*	16q24.2
CDKN2A*	09p21	HIC1*	17p13.3
CDKN2B*	09p21	BRCA1*	17q21
DAPK1*	09q34.1	BCL2	18q21.3
CREM	10p12.1	KLK3	19q13
AI651963	10p14	TIMP3*	22q12.3
PTEN*	10q23.31		

Tabelle 3. Untersuchte Tumorsuppressorgene des Kits Salsa MS-MLPA ME001 TSG probemix. Die mit * markierten Gene können auch hinsichtlich möglicher Methylierungen untersucht werden.

Gen	chromosomaler Locus	Gen	chromosomaler Locus
TP73*	01p36	WT1*	11p13
MSH6*	02p16	GSTP1*	11q13
RARB*	03p24	ATM*	11q23
VHL*	03p25.3	ATM	11q23
CASR	03q21	IGSF4*	11q23
IL2	04q26	PAH	12q23
APC	05q22	CHFR*	12q24.33
TNXB	06p21.3	BRCA2*	13q12.3
ESR1*	06q25.1	RB1*	13q14.2
PARK2	06q26	RB1*	13q14.2
PARK2	06q26	MLH3	14q24.3
PAX5*	09p13	THBS1*	15q15
CDKN2A*	09p21	PYCARD*	16p12
PTCH	09q22.3	TSC2	16p13.3
CREM	10p12.1	CDH13*	16q24.2
PTEN*	10q23.3	PMP22	17p12
PTEN	10q23.3	TP53*	17p13.1
MGMT*	10q26	BRCA1*	17q21
MGMT*	10q26	STK11*	19p13.3
CD44*	11p12	GATA5*	20q13.33
PAX6*	11p13		

Tabelle 4. Untersuchte Tumorsuppressorgene des Kits Salsa MS-MLPA ME002 TSG probemix. Die mit * markierten Gene können auch hinsichtlich möglicher Methylierungen untersucht werden.

3. 4. Densitometrie

Nach Ablauf der MLPA-Reaktion wurden die PCR-Produkte mit Hilfe eines LICOR-Gels aufgetrennt und anschließend die Signalstärke der einzelnen Banden mit Hilfe des Auswertungsprogrammes ImageMaster TotalLab v2.01 densitometrisch erfasst. Wie in der nachfolgenden Abbildung erkennbar, wurden die detektierten Grausignale der Banden einer Tumorseite in eine grafische Darstellung übersetzt. Nach Subtraktion der Hintergrundsignale

wurde nun die Signalstärke der einzelnen Bande als Fläche unter der Kurve als Zahlenwert erfasst. Weiterhin erfolgte die Bestimmung des relativen Anteils des Signals einer einzelnen Bande an der Stärke des Gesamtsignals einer Tumorprobe (globale Normalisierung). Dieser Zwischenwert wurde anschließend anhand der Mittelwerte der Einzelsignale aus 3 (1. Durchlauf) bzw. 2 (2. Durchlauf) Kontrollproben normalisiert. Die dafür verwendete DNS stammte aus Blutproben ohne bekannte pathologische Eigenschaften und wurde simultan auf das LICOR-Gel aufgetragen.

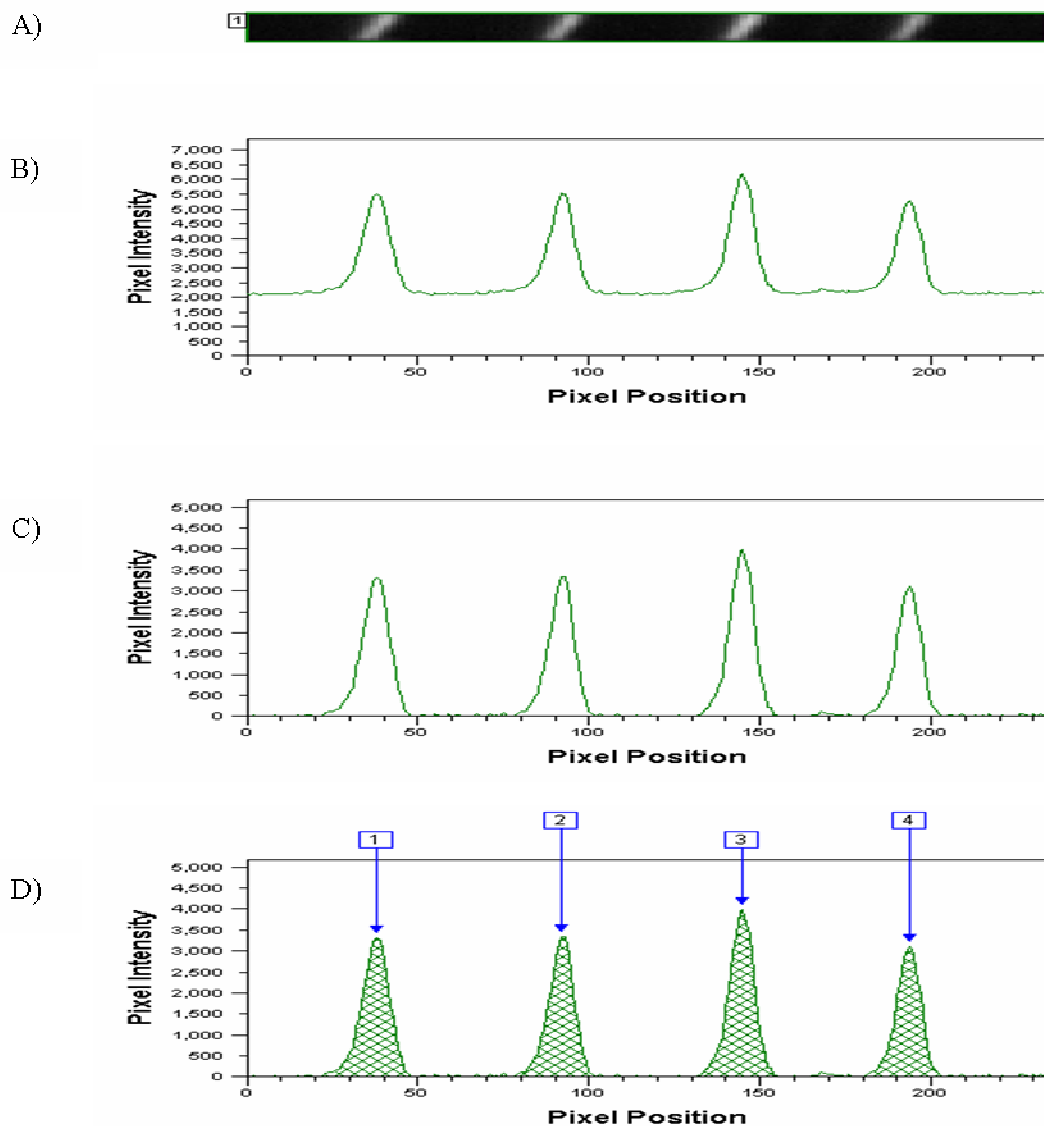


Abbildung 2 : Darstellung der densitometrischen Auswertung an 4 Einzelsignalen

Nach Auftrennung der einzelnen PCR-Produkte mit Hilfe eines LICOR-Gels (A) wird die Stärke der verschiedenen Grausignale als Kurve erfasst (B). Anschließend erfolgt eine Subtraktion der Hintergrundsignale (C). Die quantitative Erfassung der Signalstärke ergibt sich aus der Fläche unter der Kurve (D).

3. 5. Detektion von Aberrationen

Als Referenzwerte für die Detektion von Kopienzahlveränderungen gelten die von Schouten *et al.* veröffentlichten Empfehlungen. Danach wird eine Signalstärke von $< 0,7$ als Deletion und eine Signalstärke von $> 1,3$ als Amplifikation bewertet (Schouten *et al.* 2002). Als Negativ-Kontrolle fungierte hierbei ebenfalls die DNS der Blutproben ohne bekannte pathologische Eigenschaften. Die gesteigerte Aussagekraft einer mehrfachen Untersuchung eines Gens wurde bei den Berechnungen hinsichtlich einer möglichen Aberration berücksichtigt. So wurde bei Vorliegen von 2 Werten für ein Gen zunächst der Mittelwert aus beiden Proben bestimmt. Um einer tendenziellen Gewichtung der Werte in Richtung Deletion oder Amplifikation gerecht zu werden, erfolgte die Zuordnung dabei an den Referenzwerten $< 0,8$ (Deletion) und $> 1,2$ (Amplifikation). Analog erfolgte bei Vorliegen von 3 Werten für ein Gen nach Bestimmung des Mittelwerts die Zuordnung anhand der Referenzwerte $< 0,9$ (Deletion) und $> 1,1$ (Amplifikation).

Der Nachweis von Methylierungen hingegen kann ohne zusätzliche densitometrische Auswertung anhand zusätzlicher Banden abgelesen werden.

4. Ergebnisse

4. 1. Histopathologie der untersuchten Tumoren

4. 1. 1. Meningeome

Die untersuchten Meningeome weisen in der histologischen Aufarbeitung die charakteristischen und tumorspezifischen Merkmale auf (siehe untere Abbildung 3). Dabei zeichnen sich die verschiedenen histopathologischen Subtypen der Meningeome durch eine besondere morphologische Diversität aus. Die Tumorzellen stellen sich vor allem bei den transitionalen Meningeomen durch eine gleichförmige, polyedrische Form mit rundem Zellkern dar. Weiterhin zeigen Meningeome gehäuft typische wirbelförmige Strukturen unterschiedlicher Größe. Durch hyaline Umwandlung der im Zentrum gelegenen eosinophilen Zellen können diese Verwirbelungen unter Bildung von Psammonkörperchen verkalken. (Pietsch 2002). Exemplarisch ist ein solches Psammonkörperchen in der unteren Abbildung durch einen Pfeil gekennzeichnet.

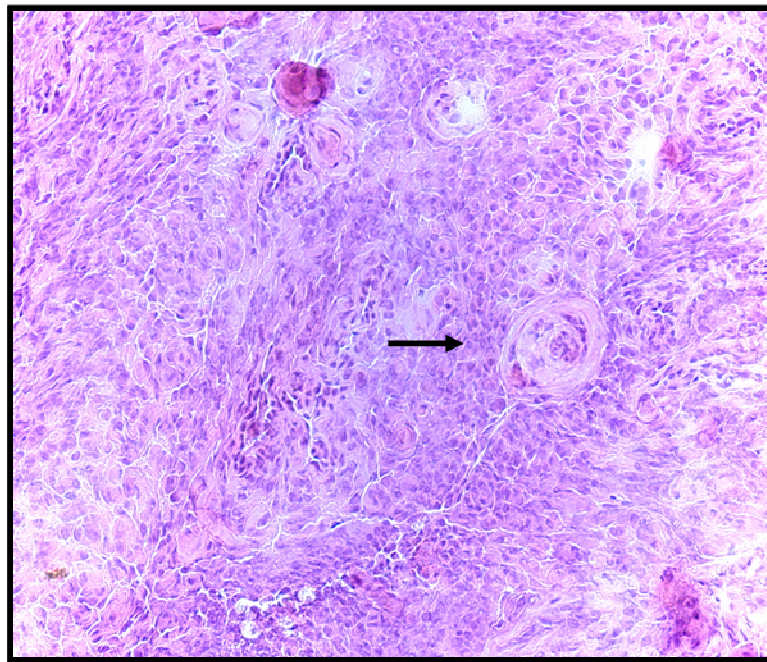


Abbildung 3 : Schnittpräparat Meningeom
Ausschnitt eines Schnittpräparats eines Meningeoms Grad I
bei 200facher Vergrößerung. Kernzeichnung eines typischen
Psammonkörpers (Pfeil). Färbung mit Hämatoxylin-Eosin.

4. 1. 2. Glioblastome

Bei der histopathologischen Untersuchung der zur Verfügung gestellten Glioblastome können zahlreiche Merkmale hoher Malignität nachgewiesen werden. Neben einer hohen Variationsbreite der Morphologie der Zellen imponieren hyperchromatische, polymorphe Zellkerne mit prominenten Nukleolen. Die meist länglich ausgezogenen Zellen charakterisieren sich durch lange fibrilläre Fortsätze und atypische Mitosefiguren. Des Weiteren können die für das Glioblastom charakteristischen Kerntrümmer und Nekrosezonen (Pietsch 2002) nachgewiesen werden. Die untere Abbildung 4 zeigt eine Vergrößerung eines mikroskopischen Präparats, welches aus einer der Tumorproben gewonnen wurde. Dabei sind neben der deutlichen Kernpolymorphie auch einzelne Nekroseherde erkennbar (Kennzeichnung Pfeil).

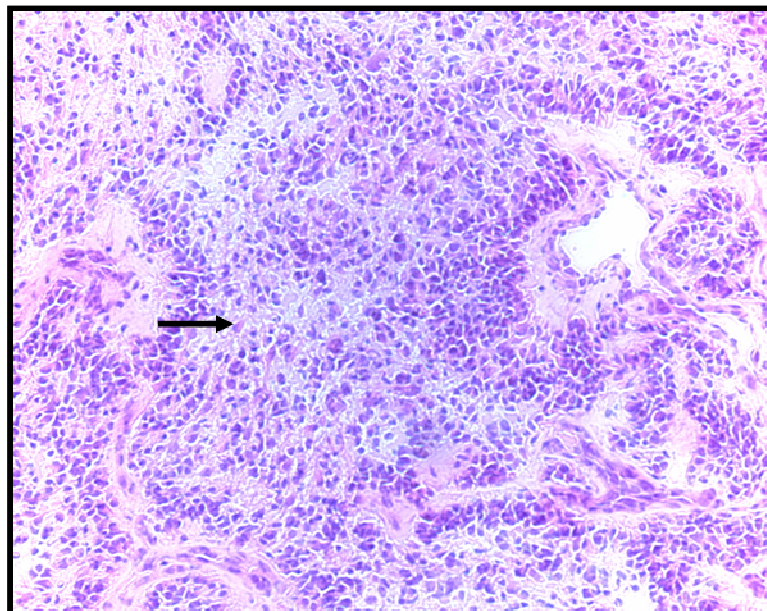


Abbildung 4 : Schnittpräparat Glioblastom
Ausschnitt eines Schnittpräparates eines Glioblastom bei 100facher Vergrößerung mit Nekrosezonen und zahlreichen Kernpolymorphien (Pfeil). Färbung mit Hämatoxylin-Eosin.

4. 1. 3. Intrakranielle Metastasen

Typischerweise stimmt das histopathologische Erscheinungsbild von intrakraniellen Metastasen nur bedingt mit dem des Primärtumors überein. Im Allgemeinen weisen die untersuchten Tumorproben eine hohe mitotische Aktivität, Kernpolymorphien und ausgedehnte Gewebsnekrosen als typisches Korrelat für eine hohe Malignität auf. Dennoch können die

metastatischen Tumoren in aller Regel scharf gegen das umliegende Gewebe abgegrenzt werden und zeigen besonders randständige Gefäßproliferationen (Pietsch 2002).

Neben den histopathologischen Eigenschaften sind bei den Metastasen einiger Primarien die immunhistochemischen Eigenschaften für eine weitere Differenzierung von Bedeutung, deren Bestimmung bei der erneuten Aufarbeitung der Tumorproben allerdings nicht gewährleistet werden konnte. Die untere Abbildung 5 zeigt exemplarisch ein typisches histopathologisches Erscheinungsbild einer intrakraniellen Metastase mit deutlicher Polymorphie der Zellen und Nukleoli.

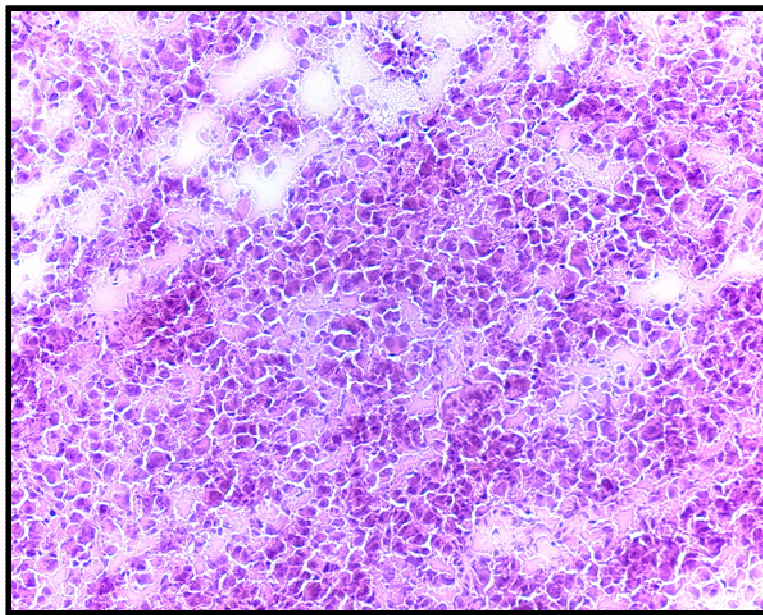


Abbildung 5 : Schnittpräparat intrakranielle Metastase
Ausschnitt eines Schnittpräparats einer intrakraniellen Metastase (Primarius: malignes Melanom) mit zahlreichen Kernpolymorphismen bei 100facher Vergrößerung. Färbung mit Hämatoxylin-Eosin.

4. 2. Qualität der Tumorproben

Die histopathologische Charakterisierung der für die vorliegende Untersuchung verwendeten Tumoren lag bereits vor. Um den für das MLPA-Verfahren empfohlenen Tumoranteil von 50 % zu gewährleisten, wurden erneut Gewebsschnitte von den einzelnen Tumorproben angefertigt. Nach anschließender Färbung mittels Hämatoxylin-Eosin erfolgte eine mikroskopische Einschätzung des quantitativen Tumoranteils. Für die weiteren Untersuchungen hinsichtlich des Inaktivierungsstatus der einzelnen Tumoren wurden nur Tumorproben mit einem spezifischen Tumoranteil zwischen 70 % und 100 % verwendet (prozentualer Anteil im Einzelnen nicht aufgeführt).

Als Bestätigung der erfolgreichen DNS-Extraktion als auch als Hinweis auf die Qualität der extrahierten DNS wurde eine Agarose-Gelelektrophorese im Anschluss an die Extraktion der DNS angefertigt. Diese konnte bei allen für die statistische Auswertung verwendeten Tumoren einen Nachweis für die vorangegangene, erfolgreiche DNS-Extraktion erbringen. Bei einer Tumorprobe konnte keine DNS nachgewiesen werden. Diese Tumorprobe wurde exemplarisch als Negativ-Kontrolle ebenfalls auf ein LICOR-Gel aufgetragen (siehe spätere Abbildungen 8, 10, 14 und 16).

Weiterhin konnten mit Hilfe der Gelelektrophorese Aussagen hinsichtlich der Qualität der verwendeten DNS getroffen werden. Exemplarisch ist die Abbildung 6 aufgeführt, die ein Agarose-Gel mit 6 DNS-Banden sowie eine Kontrollbande zur Größenbestimmung (Bahn 1) zeigt. Die Bahnen 2 bis 7 enthalten extrahierte DNS von jeweils einer Tumorprobe. Wie in der unteren Abbildung 6 verdeutlicht, erwies sich die extrahierte DNS aufgrund einer geringen Bildung von Schmier als undegradiert und hochmolekular. Des Weiteren ist die hohe Signalstärke der Bande ein Hinweis für die hohe Quantität der extrahierten DNS.

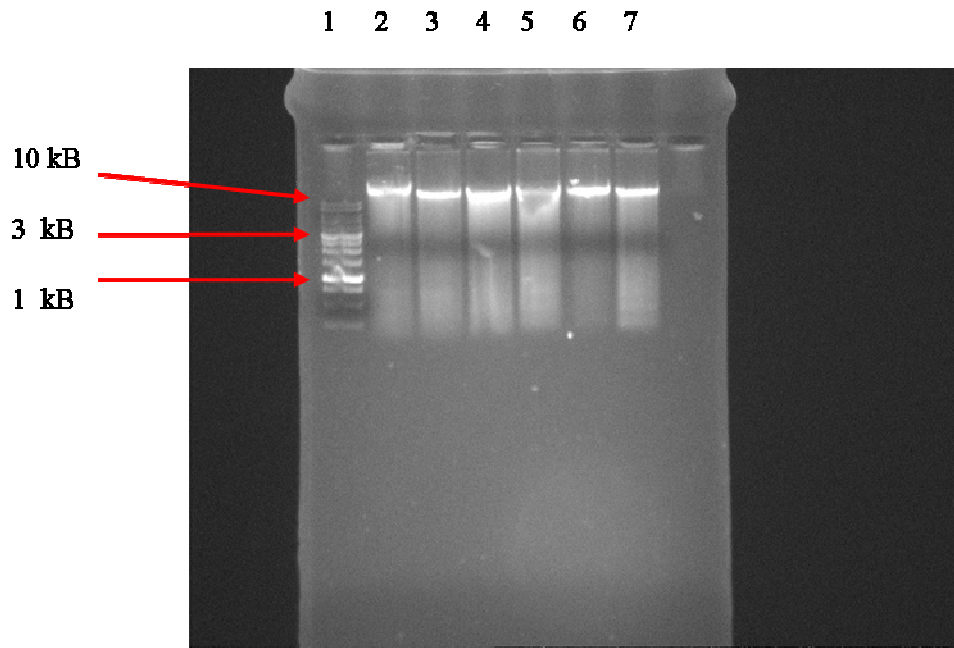


Abbildung 6 : Nachweis extrahierter DNS
 Agarose-Gelelektrophorese der extrahierten DNS von 6 Tumoren. Auftrag von DNS-Leiter in Bahn 1 zur Größenbestimmung. In den Bahnen 2 bis 7 Auftrag von extrahierter DNS verschiedener Tumorproben. Die extrahierte DNS erweist sich aufgrund geringer Schmierbildung als hochmolekular und gering degradiert. Die hohe Signalstärke der Banden spricht für eine hohe Quantität der extrahierten DNS.

4. 3. Rohdaten aus der Visualisierung der MS-MLPA-Reaktionen

Mit Hilfe der nachfolgenden Abbildungen soll die Visualisierung und Auswertung der Genprodukte der MLPA-Reaktion erläutert werden. Zusätzlich belegen die einzelnen, vergrößerten Ausschnitte, dass bei einigen PCR-Produkten auch ohne densitometrische Auswertung bereits Aberrationen feststellbar sind. Wie in Abbildung 7 erkennbar, ist eine Verminderung der Signalstärke bei einigen Banden bzw. Genprodukten deutlich wahrnehmbar und als sicherer Hinweis für eine Kopienzahlverminderung des betreffenden Gens zu werten. Die senkrechte Anordnung der Banden resultiert aus der größenabhängigen Auftrennung der Genprodukte, die durch die variable Zwischensequenz gewährleistet werden kann, welche bei einem der bindenden Oligonukleotide zusätzlich zwischen Zielsequenz und Primer eingefügt wurde (Vergleich Kapitel 1.3.2.1.). Dem Prinzip der Gelelektrophorese folgend, erscheinen die Genprodukte mit der kürzesten Zwischensequenz als Banden am unteren Bildrand. Der jeweilige Abstand zwischen den verschiedenen Banden beträgt 6 bzw. 9 Basenpaare. Die Größe der Genprodukte differiert zwischen 136 und 481 Basenpaaren.

Die in der gleichen PCR-Reaktion untersuchten Tumorproben sind auf einem LICOR-Gel in waagerechter Anordnung aufgetragen. Somit können mit einem einzelnen LICOR-Gel die PCR-Produkte einer MLPA-Reaktion von 15 Tumorproben aufgetrennt und untersucht werden, was einen deutlichen Vorteil gegenüber bekannten Untersuchungsmethoden darstellt. Ein weiterer Vorteil der simultanen Untersuchung resultiert aus den gleichen Rahmenbedingungen für die zeitgleich untersuchten Tumorproben. Bei den nachfolgenden Abbildungen sind zusätzlich die Genprodukte von jeweils 3 Kontrollproben aufgetragen. Die dafür verwendete DNS stammt aus Blutproben gesunder Probanden (Vergleich Kapitel 3.4.). Bei der Zuordnung der Banden zu den einzelnen Genprodukten sind 2 weitere Kontrollmechanismen des MLPA-Verfahrens zu beachten. Wie besonders in den Abbildungen 8 und 10 ersichtlich, erscheinen auf dem LICOR-Gel neben den 41 spezifischen Genprodukten auch 7 Kontrollbanden unterschiedlicher Bedeutung. Die untersten 4 Banden mit einer Größe zwischen 64, 70, 76 und 82 Basenpaaren dienen als Kontrollbanden und benötigen für eine Amplifikation keine vorherige Ligation. Die Verwendung einer nicht ausreichenden Menge DNS oder eine fehlerhafte Ligation wird durch eine vergleichbare oder größere Signalstärke dieser Kontrollbanden angezeigt. In den Abbildungen 8 und 10 weist jeweils eine Tumorpobe eine solche Negativ-Kontrolle auf. Da bei selbiger Tumorpobe bereits bei der vorangegangenen konventionellen Agarose-Gelelektrophorese kein DNS-Nachweis gelang, ist eine fehlende bzw. ungenügende DNS-Extraktion als ursächlich anzusehen.

Neben der Kontrolle von DNS-Quantität und Ligation wird durch 3 weitere Kontrollbanden eine ausreichende Denaturierung und Hybridisierung angezeigt. Diese Kontrollbanden bilden bei einer Größe zwischen 88, 92 und 96 Basenpaaren bei ausreichender Denaturierung und Hybridisierung die untersten Banden. Speziell weist eine im Vergleich zu den weiteren PCR-Produkten verminderte Signalstärke der 2. Bande (92 Basenpaare) eine nicht ausreichende Hybridisierung an. Die Zielsequenzen der beiden weiteren Kontrollbanden mit einer Größe von 88 und 96 Basenpaaren sind jeweils durch zahlreiche Cytosin-Guanin-Sequenzen gekennzeichnet. Eine spezifische physiko-chemische Eigenschaft von Cytosin-Guanin-Sequenzen ist eine höhere Stabilität gegenüber Denaturierungsprozessen. Entsprechend liefern beide Kontrollbanden bei mit den übrigen Genprodukten vergleichbarer Signalstärke einen Hinweis auf eine ausreichende, stattgehabte Denaturierung im Rahmen der PCR-Reaktion.

Oberhalb der Kontrollbanden sind vereinzelt zusätzliche Banden darstellbar, welche als Artefakte zu bewerten sind. Im Verlauf der Darstellung und Auswertung der Genprodukte

treten weitere Artefakte in nur geringer Anzahl und mit deutlich verminderter Signalstärke in Erscheinung.

Bei der Auswertung des Methylierungsstatus der einzelnen Gene stellt sich eine mögliche Methylierung durch die Anwesenheit weiterer Banden deutlich dar (Vergleich Kapitel 1.3.2.2.). Analog der Bestimmung der Kopienzahlanomalien sind die untersuchten Tumoren in waagerechter und die Genprodukte in senkrechter Anordnung ausgerichtet. Zu beachten ist dabei, dass nicht alle auf Kopienzahlveränderung untersuchten Gene auch hinsichtlich möglicher Methylierungen untersucht werden können. Aufgrund der Bindungsspezifität der dazu verwendeten Methylgruppen-sensitiven Endonuklease, welche zur Bindung eine Cytosin-Guanin-Cytosin-Guanin-Sequenz innerhalb der Zielgens benötigt, können nicht bei allen auf Kopienzahlanomalien untersuchten Gene auch epigenetische Veränderungen detektiert werden. Promotormethylierungen können nur bei 53 (26 Gene durch Kit 1 und 27 Gene durch Kit 2) der insgesamt 82 Genloci (jeweils 41 in Kit 1 und Kit 2) erfasst werden, wobei vereinzelt Gene auch durch 2 Oligonukleotide untersucht wurden (18 Gene doppelt erfasst, entspricht 36 von 53 Genen) (Vergleich Kapitel 1.3.2.2.). Wie in den nachfolgenden Abbildungen 14 bis 17 ersichtlich, sind dadurch sind bei jedem Tumor jeweils 15 Genprodukte bzw. Banden ohne Aussagekraft hinsichtlich einer Methylierung detektierbar. Zusätzliche Genprodukte, welche in diesem Falle eine Inaktivierung des Gens repräsentieren, können deutlich von den übrigen 15 Banden unterschieden werden. Die Differenzierung der durch methylierten Gene gelingt dabei noch deutlicher als die Wahrnehmung unterschiedlicher Signalintensitäten. Entsprechend erfolgt die Auswertung des Methylierungsstatus binär. Bei der Auswertung des Methylierungsstatus sind analog der Darstellung der Kopienzahlanomalien die bereits erläuterten Kontrollbanden zu beachten, welche eine ungenügende Hybridisierung, Ligation oder Denaturierung anzeigen.

4. 4. Häufigkeit von Kopienzahlveränderungen

Die nachfolgenden Abbildungen 7 bis 10 zeigen die Auftrennung der Genprodukte mit Hilfe eines LICOR-Gels im Rahmen der Erfassung der Kopienzahl der untersuchten Tumorsuppressorgene. Eine Differenzierung hinsichtlich Deletion oder Amplifikation der einzelnen Genprodukte erfolgte anhand der in Kapitel 3.4. und 3.5. erläuterten Kriterien. Die Genprodukte der einzelnen Tumorproben sowie der Kontrollproben sind dabei waagrecht angeordnet. Die Auftrennung mit Hilfe eines LICOR-Gels ermöglichte die simultane Detektion der Kopienzahl von jeweils 41 Tumorsuppressorgenen in senkrechter Anordnung. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse erfolgt in tabellarischer Form im Anschluss an die

Abbildungen (Tabelle 5, 6 und 7). Die unterschiedliche Häufigkeit der Kopienzahlveränderungen wird anschließend zusätzlich grafisch dargestellt, um die quantitativen Unterschiede zwischen den untersuchten Entitäten zu verdeutlichen (Abbildungen 11 und 12).

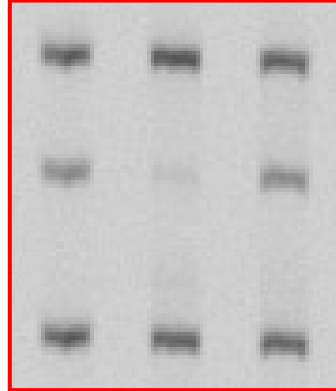
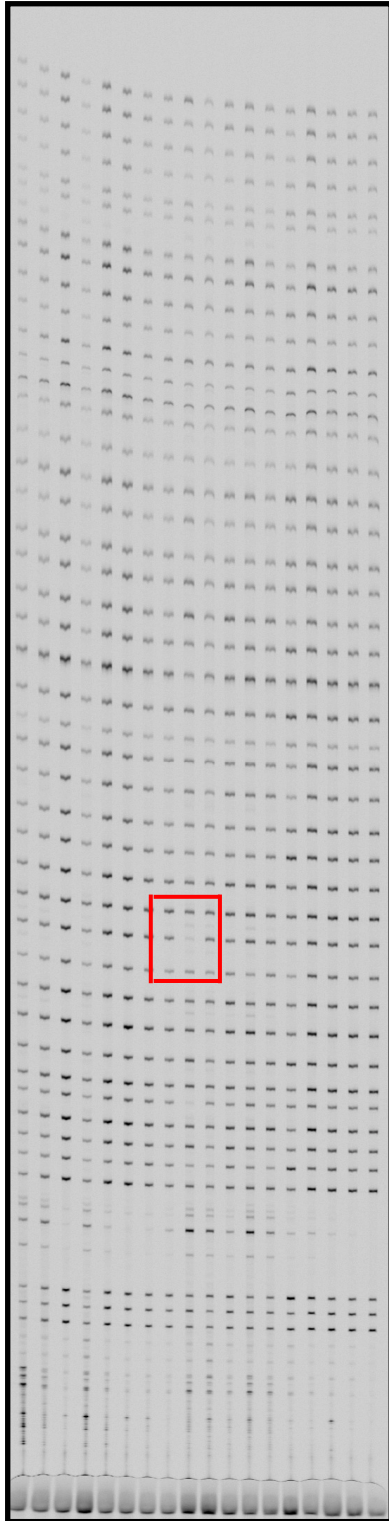


Abbildung 7 :

LICOR-Gelauftrag der MLPA-Genprodukte des Tumor-Suppressor Kits 001. In waagerechter Anordnung sind 15 Tumoren und 3 Kontrollproben aufgetragen. Senkrechte Auftrennung der 41 Genprodukte mit einer Größe zwischen 136 und 481 Basenpaaren bei einer Größendifferenz von 6 bzw. 9 Basenpaaren. Die unteren 3 Banden dienen als Positiv-Kontrolle zum DNS-Nachweis. Unterschiedliche Signalintensitäten sind deutlich wahrnehmbar (Vergrößerung).

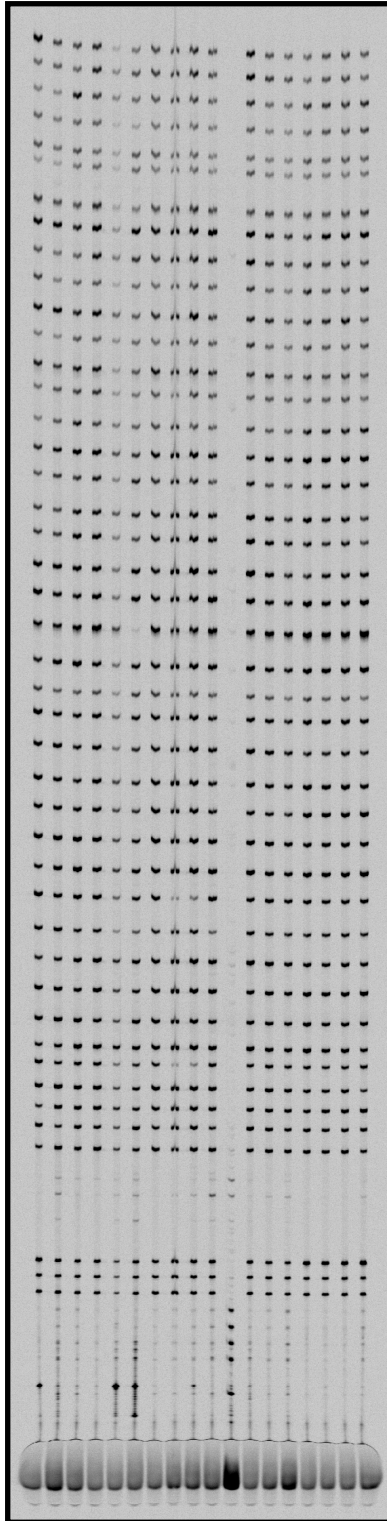


Abbildung 8 :

2. LICOR-Gelauftrag der MLPA Genprodukte des Tumor-Suppressor-Kits 001. In waagerechter Anordnung sind weitere 15 Tumoren und 3 Kontrollproben aufgetragen.

Senkrechte Auftrennung der 41 Genprodukte mit einer Größe zwischen 136 und 481 Basenpaaren bei einer Größendifferenz von 6 bzw. 9 Basenpaaren.

Die untersten 3 Banden dienen als Positiv-Kontrolle zum DNS-Nachweis. In einer Bahn fehlende Genprodukte und Detektion der Kontrollproben zum Nachweis fehlender DNS. Bereits in der vorangegangenen Gelelektrophorese konnte bei betreffender Tumorprobe keine DNS nachgewiesen werden.

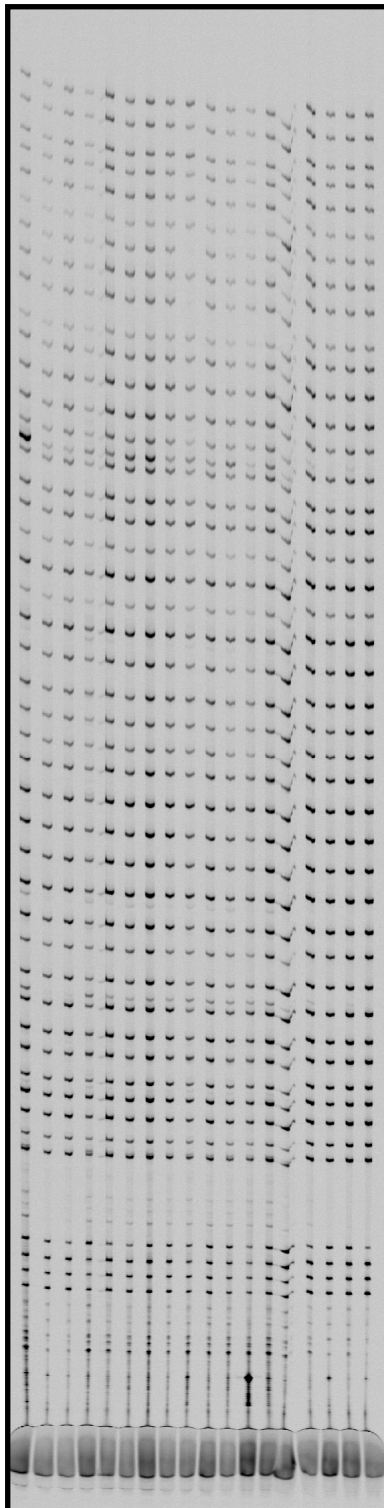


Abbildung 9 :

LICOR-Gelauftrag der MLPA Genprodukte des Tumor-Suppressor-Kits 002. In waagerechter Anordnung sind 15 Tumoren und 3 Kontrollproben aufgetragen. Senkrechte Auftrennung der 41 Genprodukte mit einer Größe zwischen 136 und 481 Basenpaaren bei einer Größendifferenz von 6 bzw. 9 Basenpaaren. Die untersten 3 Banden dienen als Positiv-Kontrolle zum DNS-Nachweis. Ursache der zusätzlichen 4. Bande unklar. Artefaktüberlagerung in einer Bahn erkennbar.

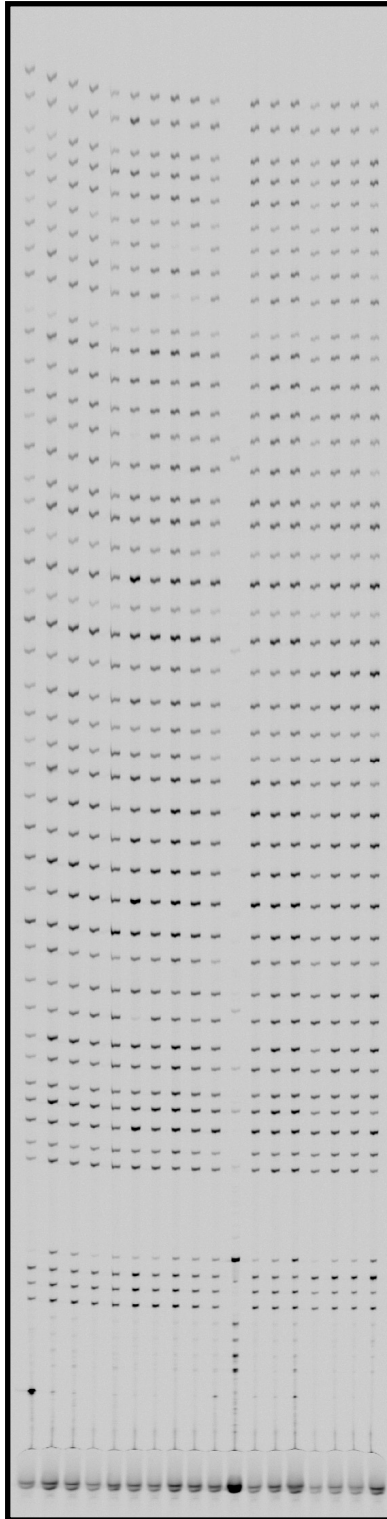


Abbildung 10 :

2. LICOR-Gelauftrag der MLPA Genprodukte des Tumor-Suppressor-Kits 002. In waagerechter Anordnung sind weitere 15 Tumoren und 3 Kontrollproben aufgetragen. Senkrechte Auftrennung der 41 Genprodukte mit einer Größe zwischen 136 und 481 Basenpaaren bei einer Größendifferenz von 6 bzw. 9 Basenpaaren. Die untersten 3 Banden dienen als Positiv-Kontrolle zum DNS-Nachweis. Fehlende Genprodukte und Auftrennung der Kontrollproben zum Nachweis fehlender DNS in einer Bahn. Bereits in der vorangegangenen Gelelektrophorese konnte bei betreffender Tumorprobe keine DNS nachgewiesen werden.

	Meningeom Grad I	Meningeom Grad II / III	Gliom	Metastase
Anzahl Tumoren	10	5	7	7
Range (Median)	1-11 (3,5)	0-11 (4)	2-8 (6)	7-16 (9)
Durchschnitt	4,4	5,2	5,4	9,7

Tabelle 5. Zusammenfassung der detektierten Deletionen

	Meningeom Grad I	Meningeom Grad II/ III	Gliom	Metastase
Anzahl Tumoren	10	5	7	7
Range (Median)	0-6 (1)	0-7(3)	1-6(2)	2-10(7)
Durchschnitt	1,4	3	2,7	7

Tabelle 6. Zusammenfassung der detektierten Amplifikationen. Das Ausmaß Kopienzahlvermehrung wurde vernachlässigt.

	Meningeom Grad I	Meningeom Grad II/ III	Gliom	Metastase
Anzahl Tumoren	10	5	7	7
Summe Aberrationen	58	41	57	117
Range/ Median	2-12 (4,5)	3-18 (7)	3-12 (9)	9-24 (16)
Durchschnitt Aberrationen	5,8	8,2	8,1	16,7

Tabelle 7. Zusammenfassung der detektierten Kopienzahlveränderungen

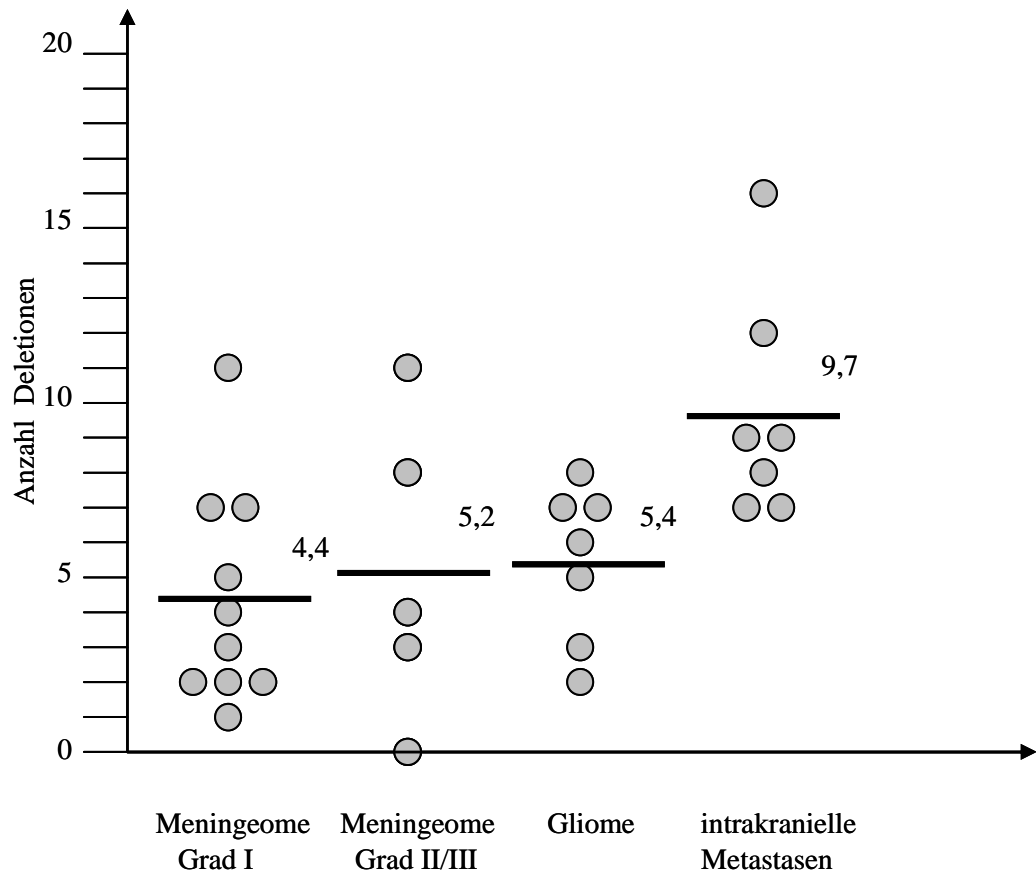


Abbildung 11 :

Darstellung der durchschnittlichen Häufigkeit von Deletionen der verschiedenen Tumor-Entitäten. Gegenüber Meningeomen und Gliomen sind bei intrakraniellen Metastasen deutlich mehr Deletionen nachweisbar. Des Weiteren imponieren deutlich höhere Minima und Maxima in der Gruppe der Metastasen. Die untersuchten Meningeome weisen nur geringe Häufigkeitsunterschiede zur Gruppe der Gliome auf.

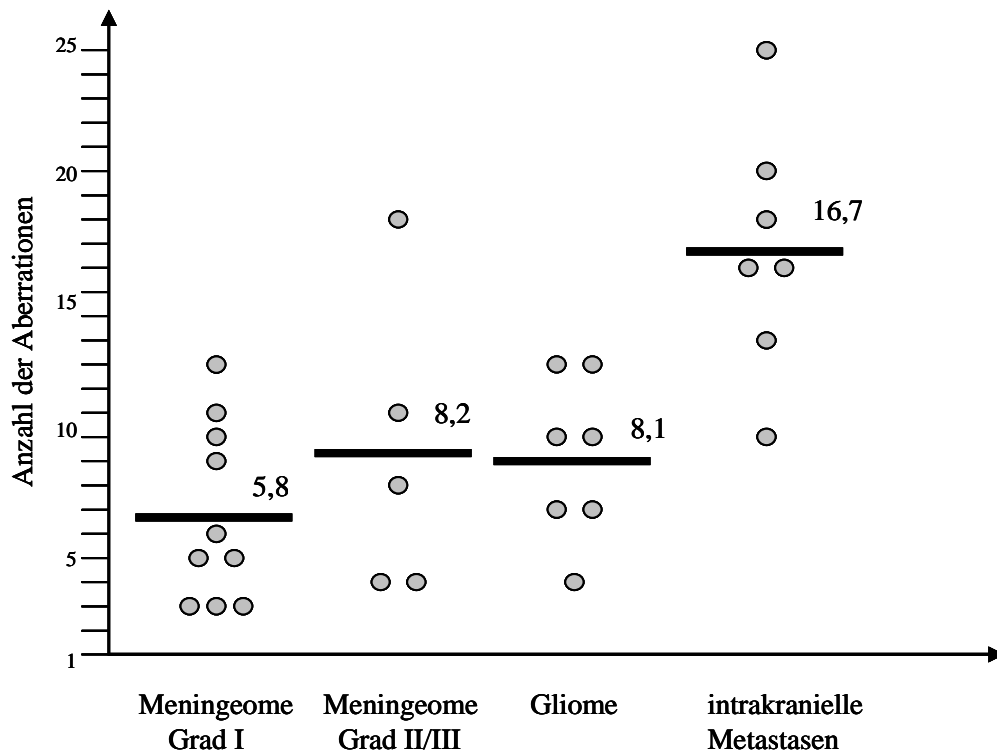


Abbildung 12 :

Darstellung der durchschnittlichen Häufigkeit der detektierten Kopienzahlveränderungen der verschiedenen Tumorentitäten. Die unterschiedliche Quantität wird in der gemeinsamen Darstellung noch stärker verdeutlicht (Vergleich Abbildung 11). Sowohl die durchschnittliche Anzahl als auch Minima und Maxima sind in der Gruppe der intrakraniellen Metastasen höher als in der Gruppe der Meningeome und Gliome. Des Weiteren fällt ein deutlicher Unterschied der durchschnittlichen Aberrationshäufigkeit innerhalb der Gruppe der Meningeome auf.

4. 4. 1. Häufigkeit von Kopienzahlveränderungen der verschiedenen Entitäten

Innerhalb der untersuchten Tumorproben ist mit steigendem Malignitätsgrad eine quantitative Zunahme der Aberrationen zu erkennen. Während die Quantität der Deletionen innerhalb der Gruppe der Meningeome weitestgehend vergleichbar ist (4,4 gegenüber 5,2) und sich auch nur gering von der Häufigkeit der Deletionen bei Gliomen unterscheidet (5,4), ist ein deutlicher Anstieg der durchschnittlichen Anzahl der Deletion bei intrakraniellen Metastasen zu vernehmen (9,7).

Ebenso deutlich ist der Unterschied zwischen primären Hirntumoren (Meningeome und Gliome) und Metastasen bei Betrachtung der Häufigkeit von Amplifikationen. Dabei weisen Meningeome durchschnittlich 1,4 (Grad I) und 3,0 (Grad II und III) Amplifikationen auf. Während innerhalb der untersuchten Gruppe von Gliomen nur geringfügiger weniger

Kopienzahlvermehrungen detektiert werden konnten (durchschnittlich 2,7), imponieren die intrakraniellen Metastasen mit durchschnittlich 7 Amplifikationen je Tumor.

Ebenso deutlich ist die quantitative Zunahme der Genveränderungen in der Zusammenfassung der Abberationen erkennbar. Während benigne Meningeome nur durchschnittlich 5,8 Aberrationen (Standardabweichung 3,5) aufweisen, steigt die Anzahl der durchschnittlichen Aberrationen bei atypischen und anaplastischen Meningeomen sowie Gliomen auf 8,2 (Standardabweichung 5,6) bzw. 8,1 (Standardabweichung 3,1). Mit durchschnittlich 16,7 Aberrationen (Standardabweichung 4,5) je untersuchten Tumor weisen die intrakraniellen Metastasen auch insgesamt am häufigsten Genveränderungen auf.

Die nachfolgende Abbildung 13 gibt neben einer Darstellung der unterschiedlichen Häufigkeit der genetischen Aberrationen und den jeweiligen Standardabweichungen eine Aussage hinsichtlich der Signifikanz der erhobenen Ergebnisse. Dabei wurden die Kopienzahlveränderungen der einzelnen Tumorproben der verschiedenen Entitäten einem T-Test unterzogen. Die erhobenen Ergebnisse der Meningeome (sowohl Grad I als auch Grad II und III) weisen besonders im Vergleich zu der Gruppe der intrakraniellen Metastasen eine hohe Signifikanz auf ($p < 0,01$). Bei der Gruppe der Gliome ist im Vergleich zur Gruppe der intrakraniellen Metastasen hinsichtlich der Signifikanz der Ergebnisse ein Trend erkennbar ($p < 0,01$).

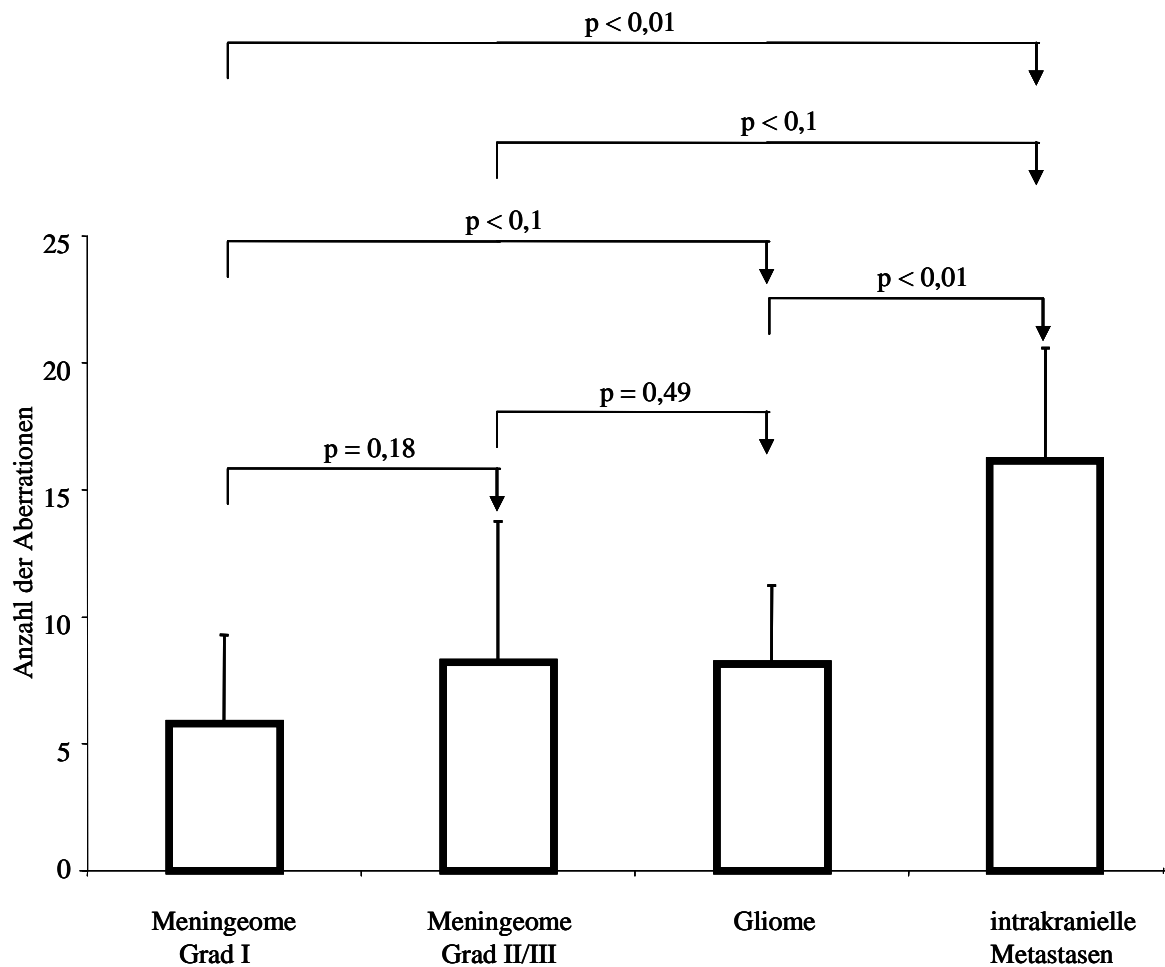


Abbildung 13:

Darstellung der durchschnittlich detektierten Kopienzahlveränderungen sowie Standardabweichung und Signifikanz der Ergebnisse zu den einzelnen Gruppen.

4. 4. 2. Häufig betroffene Genabschnitte / Tumorsuppressorgene

4. 4. 2. 1. *VHL*

Unter den untersuchten Tumorproben konnte bei dem Tumorsuppressorgen *VHL* am häufigsten Kopienzahlveränderungen nachgewiesen werden. Mit Hilfe von 2 MLPA-Proben konnten 21 insgesamt Aberrationen detektiert werden. Die Aberrationen sind dabei ausschließlich Deletionen und kommen in allen untersuchten Entitäten vor. Das auf dem Chromosom 3p lokalisierte Gen ist innerhalb der untersuchten Tumorproben bei 12 von 15 Meningeomen (80 %), 5 von 7 Gliomen (71 %) und 4 von 7 intrakraniellen Metastasen (57 %) deletiert.

4. 4. 2. 2 BRCA 1

Das mittels 2 MLPA-Proben untersuchte Gen BRCA 1 wies bei den Untersuchungen der Tumorproben insgesamt 15 Deletionen auf (10 von 15 Meningeomen [66 %], 1 von 7 Gliomen [14 %] und 4 von 7 intrakraniellen Metastasen [57 %]). Damit ist das BRCA1-Gen innerhalb der untersuchten Tumorproben am zweithäufigsten von Deletionen betroffen.

Für das dem Chromosoms 17q lokalisierte Gen konnte innerhalb der Tumorproben ebenfalls keine Amplifikation nachgewiesen werden.

4. 4. 2. 3. PYCARD

Insgesamt 16 Aberrationen konnten für das Tumorsuppressorgen PYCARD mit Hilfe einer MLPA-Probe nachgewiesen werden. Während dabei bei Meningeomen (7 von 15 [47 %]) und Gliomen (3 von 7 [43 %]) ausschließlich Deletionen detektiert werden konnten, wiesen die untersuchten intrakraniellen Metastasen neben Deletionen (4 von 7 [57 %]) auch Amplifikationen des auf dem Chromosom 16p lokalisierten Gens auf (2 von 7 [29 %]).

4. 4. 2. 4. IL2

Das Tumorsuppressorgen IL2, welches auf dem Chromosom 4q lokalisiert ist, weist innerhalb der Tumorproben 12 Aberrationen auf. Im Gegensatz zur Mehrheit der untersuchten Gene sind die Veränderungen der Kopienzahl überwiegend Amplifikationen. So summieren sich 4 Amplifikationen innerhalb der Meningeome (27 %) und jeweils 3 Amplifikationen (43 %) in der Gruppe der Gliome und intrakraniellen Metastasen zu insgesamt 10 Amplifikationen.

Weiterhin konnten innerhalb der Gruppe der intrakraniellen Metastasen je eine Deletion nachgewiesen werden (je 14 %). Der Nachweis von Kopienzahlveränderungen des IL2-Gens erfolgte mit Hilfe einer MLPA-Probe.

4. 4. 2. 5. CDK6

Mit insgesamt 10 Amplifikationen ist das Tumorsuppressorgen CDK6 gemeinsam mit dem Tumorsuppressorgen IL2 am häufigsten von Kopienzahlvermehrungen betroffen. Dabei zeigt sich mit 3 betroffenen Meningeomen (20 %), 3 betroffenen Gliomen (43 %) und 4 betroffenen Metastasen (57 %) eine heterogene Verteilung der Amplifikationen des auf dem Chromosom 7q lokalisierten Gens. Hingegen konnten innerhalb der untersuchten Tumorproben keine Deletionen des untersuchten Genabschnitts festgestellt werden.

4. 5. Vergleich der Gesamthäufigkeit von Deletionen und Amplifikationen

In Abhängigkeit von der Tumorentität zeigt sich ein heterogenes Verteilungsmuster der detektierten Kopienzahlveränderungen. Dabei konnten insgesamt häufiger Deletionen als Amplifikationen nachgewiesen werden (176 Deletionen gegenüber 97 Amplifikationen). Auch innerhalb der einzelnen Entitäten konnten jeweils mehr Deletionen als Amplifikationen nachgewiesen werden. Die Gesamthäufigkeit der Deletionen divergiert dabei zwischen 44 (Meningeome Grad I), 26 (Meningeome Grad II und III), 38 (Gliome) und 68 (intrakranielle Metastasen) Deletionen. Im Vergleich weisen die untersuchten Tumorproben mit 14 (Meningeome Grad I), 15 (Meningeome Grad II und III), 19 (Gliome) und 49 (intrakranielle Metastasen) deutlich seltener Amplifikationen auf (Vergleich Tabellen 5, 6 und 7).

4. 6. Häufigkeit von Promotormethylierungen

Neben den detektierten genetischen Veränderungen, können mit Hilfe beider MS-MLPA Tumorsuppressor-Kits auch epigenetische Veränderungen in Form von Promotormethylierungen nachgewiesen werden. Analog des Nachweises von Kopienzahlveränderungen erfolgte der Auftrennung der Genprodukte der einzelnen Tumore in senkrechter Anordnung. Die unterschiedlichen Tumorproben sowie drei Kontrollproben sind in waagerechter Anordnung aufgetragen. Die Auswertung des Methylierungsstatus erfolgte im Gegensatz zu den numerischen Aberrationen binär (Vergleich Kapitel 3.4.). Aufgrund der Bindungsspezifität der verwendeten DNase HhaI können nicht alle Tumorsuppressorgene hinsichtlich möglicher Promotormethylierungen untersucht werden (Vergleich Kapitel 3.3.). Die nachfolgenden Abbildungen 14 bis 17 verdeutlichen die Detektion der als zusätzlichen Banden in Erscheinung tretenden Promotormethylierungen. Im Anschluss an die Abbildungen folgt eine tabellarische Zusammenstellung der erfassten Promotormethylierungen (Tabelle 8) und dem Anteil der zweifachen Methylierungen bei Tumorsuppressorgenen, die durch 2 MLPA-Proben hinsichtlich möglicher Methylierungen untersucht wurden (Tabelle 9).

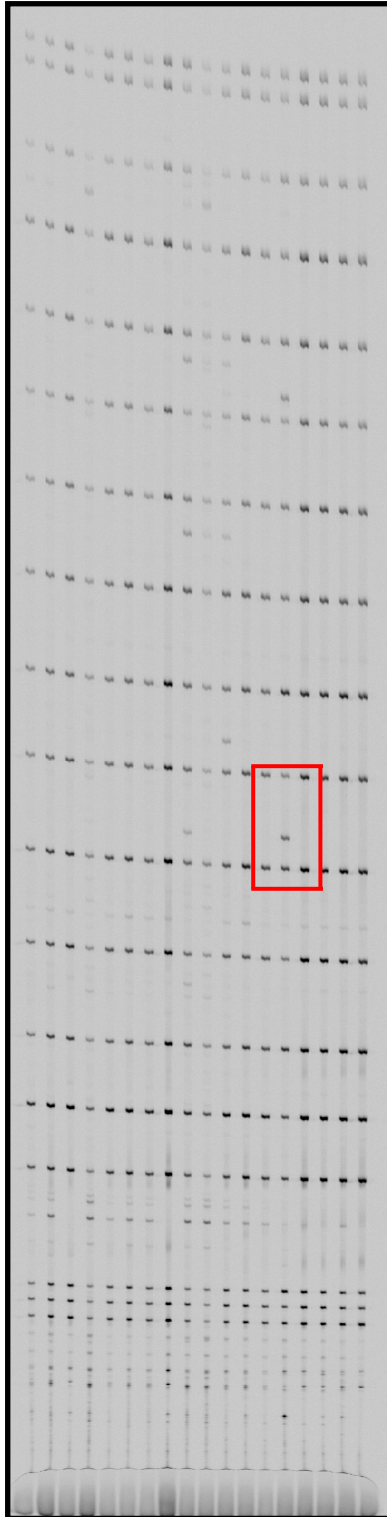


Abbildung 14 :

LICOR-Gelauftrag der MS-MLPA-Genprodukte des Tumor-Suppressor-Kits 001 nach Verdau mit Methylgruppen-sensitiver DNase Hha 1. In waagerechter Anordnung Auftrag von 15 Tumoren und 3 Kontrollproben. Senkrechte Auftrennung der Genprodukte der methylierten Tumorsuppressorgene und der 15 nicht-sensitiven Tumorsuppressorgene, die aufgrund fehlender CGCG-Bindungssequenz innerhalb der Promotoren als Positiv-Kontrolle für die Bindungsspezifität dienen. Promotor-methylierungen sind eindeutig differenzierbar (Vergrößerung). Die 3 untersten Banden dienen als Positiv-Kontrolle zum DNS-Nachweis.

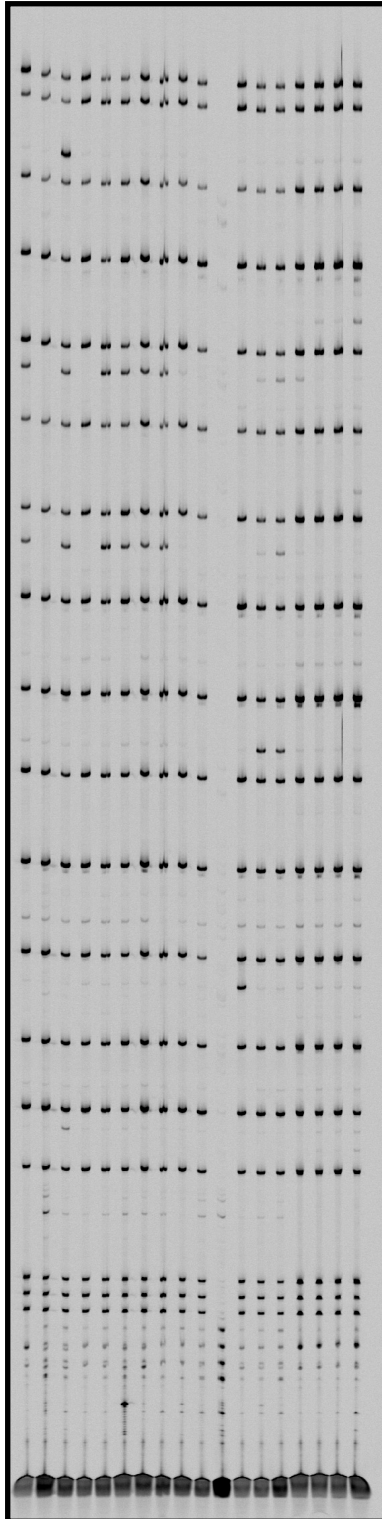


Abbildung 15 :

2. LICOR-Gelauftrag der MS-MLPA Genprodukte des Tumor-Supressor-Kits 001 nach Verdau mit Methylgruppen-sensitiver DNase Hha1. In waagerechter Anordnung Auftrag von 15 weiteren Tumoren und 3 Kontrollenproben. Analog der Auswertung der Kopienzahlveränderung konnten bei einer Tumorprobe keine Genprodukte nachgewiesen werden. Bereits bei der vorangegangenen Agarose-Gelelektrophorese konnte bei betreffender Tumorprobe keine erfolgreiche DNS-Extraktion nachgewiesen werden. Dabei Ausschlag der untersten 4 Banden als Hinweis auf unzureichende Menge bzw. Fehlen von DNS. Bei den übrigen Tumorproben Ausschlag der unteren 3 Banden als Positiv-Kontrolle für ausreichende DNS- Quantität. Neben den 15 regulären Genprodukten weisen zahlreiche zusätzliche Banden eine Methylierung der entsprechenden Region an.

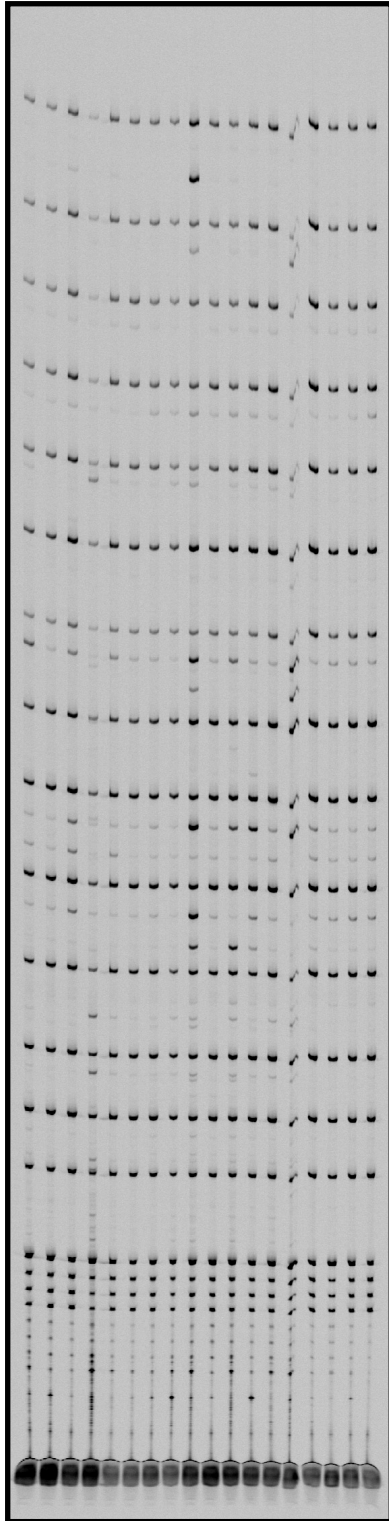


Abbildung 16 :

LICOR-Gelauftrag der MS-MLPA-Genprodukte des Tumor-Suppressor Kits 002 nach Verdau mit Methylgruppen-sensitiver DNase Hha1. In waagerechter Anordnung Auftrag von 15 Tumoren und 3 Kontrollproben. In senkrechter Anordnung Auftrennung der Genprodukte. Erneut sind zahlreiche zusätzliche Banden erkennbar. Artefakt-Überlagerung bei der Auftrennung der Genprodukte einer Tumorprobe. Die unteren 3 Banden dienen als Positiv-Kontrolle zum Nachweis einer ausreichenden DNS-Menge.

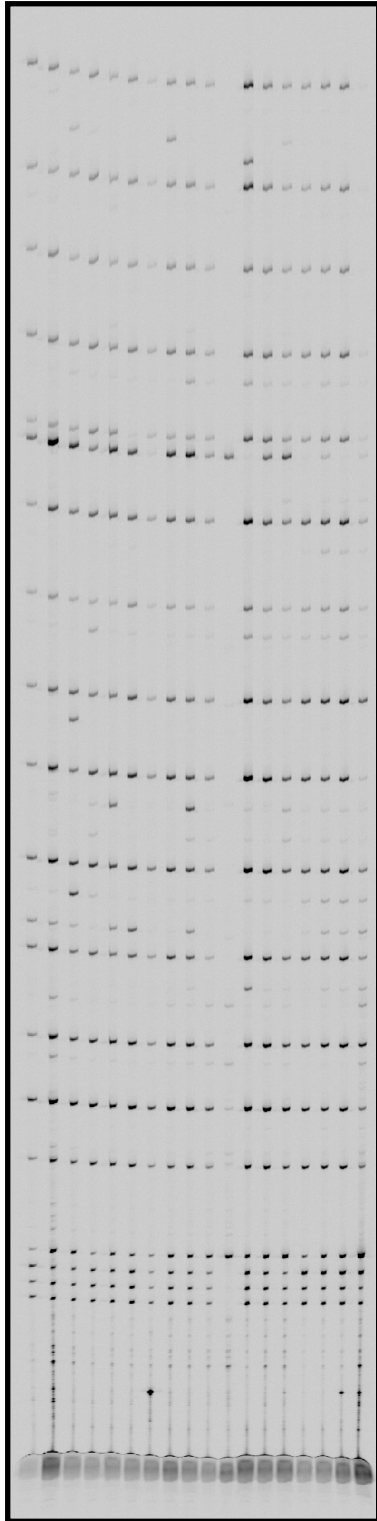


Abbildung 17 :

LICOR-Gelauftrag der MS-MLPA-Genprodukte des Tumor-Suppressor-Kits 002 nach Verdau mit Methylgruppen-sensitiver DNase Hha1. In waagerechter Anordnung Auftrag von weiteren 15 Tumoren und 3 Kontrollproben. Wie bereits in den vorangegangenen Untersuchungen konnten bei einer Tumorprobe keine Genprodukte nachgewiesen werden. In der betreffenden Tumor-Probe fehlen zusätzlich die untersten 3 Banden zum Nachweis einer ausreichenden Menge DNS. In senkrechter Anordnung Auftrennung der Genprodukte. Erneut sind zahlreiche zusätzliche Banden zu erkennen.

	Meningeom Grad I	Meningeom Grad II/ III	Gliom	Metastase
Anzahl Tumoren	10	5	7	7
Range/ Median	0-1 / 0	0-1 / 0	1-4 / 1	1-8 / 2
Durchschnitt	0,2	0,4	2,3	3,4

Tabelle 8. Zusammenfassung der detektierten Promotormethylierungen

Gen	1 von 2 Proben methyliert	2 von 2 Proben methyliert	Anteil der zweifachen Methylierung
CASP8	3	0	3 / 0%
CD44	3	0	3 / 0%
CDH13	2	0	2 / 0%
CHFR	0	2	4 / 100%
ESR1	3	1	5 / 40%
GSTP1	0	1	2 / 100%
MGMT	1	1	3 / 66%
RARB	0	1	2 / 100%
RASSF1	1	11	23 / 96%

Tabelle 9. Anteil des zweifachen Nachweises von Methylierungen bei Tumorsuppressorgen, die durch 2 MLPA-Proben untersucht wurden. Es wurden nur die Tumorsuppressorgene aufgelistet, bei denen durch mindestens eine MLPA-Probe eine Methylierung nachgewiesen werden konnte. Bei dem überwiegenden Teil der methylierten Tumorsuppressorgene konnte auch durch eine zweite Probe die Methylierung nachgewiesen werden. Dabei haben beide MLPA-Proben divergierende Bindungssequenzen.

4. 6. 1. Promotormethylierungen der verschiedenen Entitäten

Innerhalb der untersuchten Tumorproben weisen die verschiedenen Tumorentitäten eine unterschiedliche durchschnittliche Häufigkeit der epigenetischen Veränderungen auf. Während benigne Meningeome (Grad I) nur durchschnittlich 0,2 Methylierungen pro Tumor aufweisen (2 Methylierung bei 10 Tumoren), können bei atypischen (Grad II) und

anaplastischen (Grad III) Meningeomen durchschnittlich 0,4 Methylierungen nachgewiesen werden (2 Methylierungen bei 5 Tumoren). Ein weiterer Anstieg ist bei den Gliomen mit durchschnittlich 2,3 Methylierungen pro Tumor zu verzeichnen. Mit durchschnittlich 3,4 Methylierungen pro Tumor weist die Gruppe der intrakraniellen Metastasen am häufigsten Methylierungen auf.

Somit ist sowohl bei den Kopienzahlveränderungen (siehe Tabelle 7) als auch bei den epigenetischen Veränderungen in Form von Methylierungen eine quantitative Zunahme der Aberrationen mit steigender Malignität des betroffenen Tumors zu verzeichnen.

Während bei den benignen Meningeomen (Grad I) nur 2 von 10 Tumoren (20 %) eine einzelne Methylierung aufweisen (1x WT1 und 1x ESR1) und auch innerhalb der Meningeome vom Grad II und Grad III nur 2 von 5 Tumoren (40 %) durch jeweils 1 Methylierung gekennzeichnet sind (1x WT1 und 1x RASSF1), können bei allen Gliomen (Max = 4) und allen intrakraniellen Metastasen (Max = 8) Methylierungen nachgewiesen werden.

4. 6. 2. Häufig betroffene Genabschnitte / Tumorsuppressorgene

4. 6. 2. 1. *RASSF1A*

Innerhalb der untersuchten Tumorproben gelang bei 12 Tumoren der Nachweis von Methylierungen des RASSF1A-Gens (1x Meningeom Grad II, 5 x Gliom, 6x intrakranielle Metastase). Damit ist der Promotor des RASSF1A-Gens, welches sich auf dem Chromosom 3p befindet, innerhalb der untersuchten Tumorsuppressorgene am häufigsten methyliert. Bei 11 von 12 (96 %) Tumoren ließen sich die Methylierungen der Promotorregion durch 2 Oligonukleotide bzw. deren fehlenden Verdau nachweisen, was die Wahrscheinlichkeit einer stattgehabten Methylierung des Promoters deutlich erhöht (Vergleich Tabelle 9).

4. 6. 2. 2. *WT1*

Bei dem WT1-Gen, welches auf dem Chromosom 11p lokalisiert ist, konnte in 7 Fällen eine Methylierung der Promotorregion festgestellt werden, die sich auf alle Tumorentitäten verteilen (1x Meningeom Grad I, 1x Meningeom Grad II, 2x intrakranielle Metastase, 3x Gliom). Damit weist das WT1-Gen unter den untersuchten Genen am zweithäufigsten Promotormethylierungen auf. Da die beiden verwendeten Tumorsuppressor-Kits insgesamt nur einen einfachen Nachweis einer Promotormethylierung des WT1-Gens ermöglichen, ist

die Aussagekraft hinsichtlich eines möglichen Funktionsverlust im Vergleich zu mehrfach vertretenen Genen wie dem RASSF1-Gen weniger aussagekräftig.

4. 6. 2. 3. CASP8, CD44 und ESR1

Die Promotoren der Tumorsuppressorgene CASP8 (2q33-34), CD44 (11p12) und ESR1 (6q25.1) wiesen innerhalb der untersuchten Tumorproben in jeweils 3 Fällen eine Promotormethylierung auf. Dabei zeigten sich vor allem intrakranielle Metastasen betroffen (5 von 7 / 71 %), während nur 3 von 7 Gliomen (43 %) und 1 von 10 Meningeomen vom Grad I (10 %) Methylierungen aufwiesen. Sowohl das CD44-Gen als auch ESR1-Gen sind durch 2 MLPA-Proben auf Methylierungen untersucht worden. Nur in einem Fall gelang der Nachweis einer weiteren Methylierung des Promotors.

4. 7. Ergebnisübersicht

Die nachfolgenden tabellarischen Darstellungen sollen einen abschließenden Überblick über die erfassten Kopienzahlveränderungen und Methylierungen der untersuchten Tumorsuppressorgene geben. Die ermittelten Deletionen sind dabei rot markiert, während die Amplifikationen hellblau gekennzeichnet wurden. Die in einem weiteren Arbeitsschritt erfassten Promotormethylierungen wurden durch eine Schraffierung des entsprechenden Feldes markiert, um etwaige Kopienzahlveränderungen des gleichen Abschnitts überlappend darstellen zu können. Nur die grün gekennzeichneten Gene konnten aufgrund der Bindungsspezifität der Methylgruppen-spezifischen DNase hinsichtlich Promotormethylierungen untersucht werden (Vergleich Kapitel 3.3.). Bei der tabellarischen Darstellung ist zu beachten, dass einzelne Abschnitte mehrfach untersucht wurden (Vergleich Kapitel 3.3.). Die entsprechenden Abschnitte sind zusätzlich hervorgehoben.

Erneut wird die quantitative Zunahme der verschiedenen Aberrationen mit steigender Malignität der Tumorentität deutlich, wobei innerhalb der Entitäten neben den Deletionen der Promotoren der Gene BRCA1 und VHL keine wiederkehrenden Kopienzahlveränderungen erkennbar sind. Bei den untersuchten Gliomen und intrakraniellen Metastasen weist darüber hinaus die Promoterregion des RASSF1A-Gens häufig Methylierungen auf.

Gen	Locus	Grad I										Grad II			Grad III	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	1	2
TP73	1p36															
MSH6	2p16															
CASP8	2q33-q34															
FHIT	3p14.2															
MLH1	3p21.3															
RASSF1	3p21.3															
CTNNB1	3p22															
RARB	3p24															
VHL	3p26-p25															
CASR	3q21															
IL2	4q26															
APC	5q21															
APC	5q22															
TNXB	6p21.3															
ESR1	6q25.1															
PARK2	6q26															
CDK6	7q21.3															
PAX5	9p13															
CDKN2A	9p21															
CDKN2B	9p21															
PTCH	9q22.3															
DAPK1	9q34.1															
CREM	10p12.1															
AI651963	10p14															
PTEN	10q23.31															
MGMT	10q26															
CD44	11p12															
PAX6	11p13															
WT1	11p13															
CD44	11p13															
GSTP1	11q13															
ATM	11q23															
IGSF4	11q23															
TNFRSF1A	12p13															
TNFRSF7	12p13															
CDKN1B	12p13.1															
PAH	12q23															
CHFR	12q24.33															
BRCA2	13q12.3															
RB1	13q14.2															
MLH3	14q24.3															
THBS1	15q15															
PYCARD	16p12															
TSC2	16p13.3															
CDH1	16q22.1															
CDH13	16q24.2															
PMP22	17p12															
TP53	17p13.1															
HIC1	17p13.3															
BRCA1	17q21															
BCL2	18q21.3															
STK11	19p13.3															
KLK3	19q13															
GATA5	20q13.33															
TIMP3	22q12.3															

Tabelle 10 : Übersicht der erfassten Kopienzahlveränderungen und Methylierungen Meningeome.
Tumorsuppressorgene, die durch mehrere MLPA-Proben untersucht wurden, sind dunkel hervorgehoben.

■ = Deletion ■ = Amplifikation = Methylierung
■ = Tumorsuppressorgene können hinsichtlich Methylierungen untersucht werden

Gen	Locus	Gliome							Metastasen						
		1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7
TP73	1p36														
MSH6	2p16														
CASP8	2q33-q34														
FHIT	3p14.2														
MLH1	3p21.3														
RASSF1	3p21.3														
CTNNB1	3p22														
RARB	3p24														
VHL	3p26-p25														
CASR	3q21														
IL2	4q26														
APC	5q21														
APC	5q22														
TNXB	6p21.3														
ESR1	6q25.1														
PARK2	6q26														
CDK6	7q21.3														
PAX5	9p13														
CDKN2A	9p21														
CDKN2B	9p21														
PTCH	9q22.3														
DAPK1	9q34.1														
CREM	10p12.1														
AI651963	10p14														
PTEN	10q23.31														
MGMT	10q26														
CD44	11p12														
PAX6	11p13														
WT1	11p13														
CD44	11p13														
GSTP1	11q13														
ATM	11q23														
IGSF4	11q23														
TNFRSF1A	12p13														
TNFRSF7	12p13														
CDKN1B	12p13.1														
PAH	12q23														
CHFR	12q24.33														
BRCA2	13q12.3														
RB1	13q14.2														
MLH3	14q24.3														
THBS1	15q15														
PYCARD	16p12														
TSC2	16p13.3														
CDH1	16q22.1														
CDH13	16q24.2														
PMP22	17p12														
TP53	17p13.1														
HIC1	17p13.3														
BRCA1	17q21														
BCL2	18q21.3														
STK11	19p13.3														
KLK3	19q13														
GATA5	20q13.33														
TIMP3	22q12.3														

Tabelle 11 : Übersicht der erfassten Kopienzahlveränderungen und Methylierungen Gliome und Metastasen Tumorsuppressorgene, die durch mehrere MLPA-Proben untersucht wurden, sind dunkel hervorgehoben.

■ = Deletion ■ = Amplifikation ■ = Methylierung
■ = Tumorsuppressorgene können hinsichtlich Methylierungen untersucht werden

5. Diskussion

5. 1. Einordnung des Studiendesigns

Für die vorliegende Untersuchung von Kopienzahlveränderungen und Methylierungen der Promoterregion von Tumorsuppressorgenen bei intrakraniellen Tumoren standen 29 Tumorproben zur Verfügung, darunter 15 Meningeome (10 x Grad I, 3 x Grad II und 2 x Grad III) sowie 7 Gliome und 7 intrakraniellen Metastasen verschiedener Primarien. Methodisch andere Studien zu genetischen Aberrationen bei Hirntumoren umfassen bis zu 125 Tumorproben (Sayagués *et al.* 2004), wobei meist nur eine spezifische Tumorentität untersucht wurde. Der relativ geringe Probenumfang in der vorliegenden Untersuchung ist allerdings mit dem hier gestellten Ziel einer Prüfung der Eignung von MS-MLPA vereinbar.

Die verwendeten Kits enthalten MLPA-Proben, die durch die Firma MRC Holland zusammengestellt wurden und eine Auswahl häufig veränderter Tumorsuppressorgene bei verschiedenen Tumorentitäten darstellt. Dabei richten sich die MLPA-Proben jeweils gegen die Promotoren der untersuchten Tumorsuppressorgene. Entsprechend können mit Hilfe der verwendeten Kits keine Aussagen hinsichtlich Deletionen einzelner Exons getroffen werden. Aufgrund der Ligation beider MLPA-Proben können Punktmutationen nachgewiesen werden. Eine Erfassung aller chromosomalen Aberrationen könnte letztlich nur eine Kombination mehrerer Methoden gewährleisten.

Aufgrund der simultanen Verwendung mehrerer MLPA-Proben bietet das MS-MLPA-Verfahren den Vorteil eines multiplexen Screenings. Dies ist besonders bei der vorliegenden Untersuchung von Tumoren unterschiedlicher Entitäten von Vorteil. Neben der Erfassung bisher unbekannter Aberrationen bietet die simultane Untersuchung mehrerer Gene die Möglichkeit eines Vergleiches der unterschiedlichen Entitäten oder auch hereditärer Tumorerkrankungen, welche bisher in keinem Zusammenhang standen.

Ein wesentlicher Unterschied der vorliegenden Studie ist die ungerichtete Untersuchung von Tumorsuppressorgenen. Basierend auf Voruntersuchungen wurde bei anderen Studien die Suche nach Aberrationen auf chromosomale Abschnitte oder gar einzelne Exons eingegrenzt. Entsprechend häufiger gelang der Nachweis von spezifischen Veränderungen einzelner Abschnitte. Beispielhaft sind Untersuchungen des NF2-Gens, welches bei bis zu 70 % der Meningeome deletiert bzw. verändert ist (Ueki *et al.* 1999). Entsprechend beschränken sich weiterführende Untersuchungen vor allem auf Veränderungen des NF2-Gens. So waren bei

Untersuchungen mittels Mikrosatelliten-DNS 4 der insgesamt 24 verwendeten Marker NF-2 spezifisch. Von den untersuchten benignen Meningeomen wiesen dabei insgesamt 64 % einen Verlust des NF-2 Gens auf. (Lee *et al.* 2004).

Bei der Auswertung der Signalstärken wurde anhand der von MRC-Holland empfohlenen und in verschiedenen Studien angewendeten Grenzwerte getroffen. Dabei erfolgt nach Normalisierung der Einzelsignale am Gesamtsignal der Tumorprobe (globale Normalisierung) ein Vergleich mit der normalisierten Signalstärke der korrespondierenden Bande in einer Kontroll-DNS. Proben, die nach Normalisierung eine Signalstärke $< 0,7$ aufweisen, werden als deletiert betrachtet. Entsprechend gelten Proben mit einer Signalstärke $> 1,3$ als amplifiziert (Shouten *et al.* 2002) (Vergleich Kapitel 3.4.). Die Verwendung normalisierter Signalstärken kann bei Anwendung des MLPA-Verfahrens an Tumor-DNS Ursache systematischer Fehler sein. Bei der densitometrischen Auswertung der Kopienzahlveränderungen von Genen besteht besonders bei Tumorgewebe der Nachteil eines fehlenden Bezugspunktes. Die weiteren Bandensignale einer Tumorprobe können bei der Normalisierung der Einzelsignale nur bedingt als Referenz dienen, da es sich ebenfalls um potentiell kopienzahlveränderte Gene handelt.

Im Vergleich dazu kann der Methylierungsstatus ohne densitometrische Auswertung der Signalstärke anhand zusätzlicher Banden abgelesen werden. Aufgrund der spezifischen Erkennungssequenz des Restriktionsenzym HhaI können jedoch nicht für alle Gene die Promotormethylierungen untersucht werden (Vergleich Kapitel 3.4.). Bei der Interpretation der detektierten Promotormethylierungen ist weiterhin zu beachten, dass in unmittelbarer Umgebung der Promotorregionen viele Cytosin-Guanin-Sequenzen und somit viele potentiell methylierte Cytosine vorkommen. Anhand eines einzelnen Nachweises einer Methylierung kann somit nicht direkt auf einen heterozygoten Funktionsverlust des Gens geschlossen werden. Hingegen ist die Detektion von 2 Methylierungen mit Hilfe von 2 MLPA-Proben, welche an verschiedenen Cytosin-Guanin-Sequenzen desselben Promotors binden, ein deutlicherer Hinweis für einen möglichen heterozygoten Funktionsverlust des Gens. Tatsächlich konnten bei der Mehrzahl der Gene, deren Promotoren durch 2 MLPA-Proben auf Methylierungen untersucht wurden, auch 2 Methylierungen nachgewiesen werden, was die Wahrscheinlichkeit eines möglichen heterozygoten Funktionsverlustes des entsprechenden Tumorsuppressorgens erhöht (Vergleich Tabelle 9).

Ein weiterer Vorteil des zusätzlichen Nachweises von Methylierungen besteht in der Detektion eines möglichen homozygoten Funktionsverlustes von Genen. Wie in den zusammenfassenden Tabellen 10 und 11 ersichtlich, sind einzelne Tumorsuppressorgene

sowohl von Deletionen, als auch von Methylierungen der Promoterregion betroffen.

Keine Fehlerquelle im eigentlichen Sinne, jedoch eine die Gesamtanzahl der Kopienzahlveränderungen beeinflussender Faktor besteht in der Möglichkeit der Deletion eines größeren Chromosomenabschnittes, der Zielsequenzen für mehrere MLPA-Proben umfasst. Entsprechend könnte bei einem einmaligen Ereignis eine Kopienzahlveränderung mehrerer Tumorsuppressorgene angezeigt werden, was den Eindruck mehrerer Ereignisse bzw. einer fortschreitenden Progression vermittelt. Ein mögliches Beispiel ist in der Übersichtstabelle der detektierten Aberrationen der Meningeome erkennbar (siehe Tabelle 10). Bei dem Meningeom III-2 ist eine Deletion der Tumorsuppressorgene FHIT, MLH1 und RASSF1 rot gekennzeichnet. Alle drei Gene sind auf dem Chromosom 3p lokalisiert. Die Kopienzahl der Gene MLH1 und RASSF1 wird dabei durch MLPA-Proben nachgewiesen, welche an Sequenzen innerhalb der gleichen chromosomalen Bande binden (3p21.3). Eine Deletion des entsprechenden Chromosomenabschnitts kann somit auch als einmaliges Ereignis eine Kopienzahlveränderung der drei benachbarten Tumorsuppressorgene zur Folge haben. Ein weiteres Beispiel ist in der zusammenfassenden Tabelle 11 erkennbar. Dabei weist die Metastase 7 eine Deletion der Tumorsuppressorgene CREM und AI651963 auf, welche beide auf dem Chromosom 10p lokalisiert sind. Als weitere Beispiele dienen innerhalb der gleichen Entität die Deletionen der Gene TSC2 (16p13.3) und PYCARD (16p12), TP53 (17p13.1) und HIC1 (17p13.3) sowie CDH1 (16q22.1) und CDH13 (16q24.2). Darüber hinaus können Deletion größerer Abschnitte auch als Voraussetzung für die Entwicklung einer hohen Malignität diskutiert werden. Entsprechend ist bei der Betrachtung eines möglichen Zusammenhangs zwischen Quantität der Aberrationen und Malignität der Tumorprobe die Aussagekraft einer hohen Anzahl deletierter Gene bei Tumorproben hoher Malignität nicht eingeschränkt.

5. 2. Aberrationen der verschiedenen Entitäten

5. 2. 1. Meningeome

5. 2. 1. 1. Häufigkeit von Kopienzahlveränderungen

Die hier erfassten Aberrationen von Tumorsuppressorgenen zeigten bei den verschiedenen Entitäten ein unterschiedliches Verteilungsmuster.

Meningeome wiesen bei den Untersuchungen durchschnittlich 6,6 Aberrationen pro Tumor auf und sind unter den untersuchten Tumorproben quantitativ am seltensten von Aberrationen betroffen (siehe Tabelle 7). Bei den nachgewiesenen Kopienzahlveränderungen handelt es

sich überwiegend um Deletionen. Damit folgen die Untersuchungsergebnisse dem generellen Trend einer geringeren Häufigkeit von Amplifikationen gegenüber Deletionen.

Vergleiche zu anderen Untersuchungen bezüglich Kopienzahlveränderungen bei Meningeomen werden durch die Fokussierung auf den Abschnitt 22q in den meisten Studien erschwert (Kim *et al.* 1998, Lee *et al.* 2004, Sayagués *et al.* 2004, Prowald *et al.* 2005).

Bereits innerhalb der Gruppe der Meningeome zeigt sich eine Korrelation zum Malignitätsgrad der Tumorprobe und der Anzahl der erfassten Aberrationen. Dieser Trend wurde auch bei Untersuchungen mit Hilfe vergleichender genomischer Hybridisierung (CGH) festgestellt. Dabei wiesen Meningeome vom Grad I durchschnittlich 2,9 +/- 0,7 Aberrationen auf, während bei Meningeomen Grad II mit 9,2 +/- 1,2 und Meningeomen vom Grad III mit durchschnittlich 13,3 +/- 1,9 Aberrationen häufiger Kopienzahlveränderungen nachgewiesen werden konnten (Weber *et al.* 1997). Die Differenz zu vorliegender Studie ist wahrscheinlich erneut Resultat der Untersuchung tumorspezifischer Aberrationen.

5. 2. 1. 2. Deletionen

Mit einem Anteil zwischen 54 % bis 78 % sind Mutationen des NF-2 Gens die häufigste genetische Aberration unter den sporadischen Meningeomen (Ragel und Jensen 2005). Auch bei der Mehrzahl der höhergradigen Meningeome ist eine Inaktivierung des Neurofibromatose-Gens, welches auf dem langen Arm des Chromosoms 22 lokalisiert ist, auffällig (Zang 2001, Gutmann *et al.* 1997). Ähnliche Ergebnisse lieferten Untersuchungen, bei dem das NF-2 Gen mit Hilfe eines speziellen MLPA-Kits untersucht worden ist. Dabei wurde ein jedes der kodierenden 17 Exons des NF2-Gens durch eine MLPA-Probe untersucht und die Kopienzahl der Primerregion durch 2 weitere MLPA-Proben erfasst. Innerhalb der untersuchten Tumorproben konnten somit Aberrationen der betreffenden Abschnitte bei insgesamt 74 % der Meningeome nachgewiesen werden (Martinez-Glez *et al.* 2007).

Bei den vorliegenden Untersuchungen konnten nur bei 5 Meningeomen (33 %) Deletionen des Abschnitts 22q nachgewiesen werden. Bei der Betrachtung der Differenz zu den o. g. Voruntersuchungen ist die zur Verfügung stehende MLPA-Probe zu berücksichtigen, welche mögliche Kopienzahlveränderungen des benachbarten Tumorsuppressorgens TIMP3 auf dem Locus 22q12.3 detektieren soll. Entsprechend konnten isolierte Aberrationen des NF2-Gens bzw. des Locus 22q12.2 nicht erfasst werden. Bei den nachgewiesenen Aberrationen des TIMP3-Gens in der Gruppe der Meningeome ist aufgrund der geringen Distanz zum NF-2 Gen (3 Mb) auch die Deletion eines größeren Genabschnittes und damit ein heterozygoter Verlust des NF-2 Gens wahrscheinlich.

Meningeome vom Grad II und III unterscheiden sich von den Meningeomen vom Grad I häufig durch eine zusätzliche Deletion oder Strukturanomalie des kurzen Arms des Chromosoms 1 (Prowald *et al.* 2004). Einer Inaktivierung von Genen der Chromosomen 1p und 14q wird eine entscheidende Rolle in der Tumorprogression zugeschrieben (Bello *et al.* 1994 und 2000). Weitere bei Meningeome auftretende, bekannte Genverluste betreffen die Chromosomen 6q, 9p, 10q, 10p, 14q und 18q (Collins 2004).

Aberrationen des Abschnitts 1p konnten bei den untersuchten Tumorproben nur bei einem Meningeom nachgewiesen werden. Dabei handelt es sich um ein Meningeom des Malignitätsgrades III, was in Übereinstimmung zu o. g. Studienergebnissen steht (Prowald *et al.* 2004). Die Zielsequenz des zur Verfügung stehenden Oligonukleotids war dabei das Tumorsuppressorgen TP73 (1p36).

Aberrationen des Abschnitts 14q, die in Studien mit einer Progredienz des Malignitätsgrades bei Meningeomen korrelieren (Bello *et al.* 2000), konnten bei 4 von 15 Meningeomen nachgewiesen werden (2x Grad I und 2x Grad II). Die Zielsequenz des verwendeten Oligonukleotids war dabei das Tumorsuppressorgen MLH3 (14q24.3). Da 2 von 3 (66 %) Meningeomen des Malignitätsgrades II eine Deletion des Abschnitts aufweisen, sind die erhobenen Ergebnisse unter Berücksichtigung der geringen Anzahl der zur Verfügung stehenden Meningeome in Übereinstimmung zu bekannten Studien.

In der Gruppe der Meningeome wiesen darüber hinaus die Tumorsuppressorgene VHL (12 x), BRCA1 (10 x) und PYCARD (7 x) auffallend häufig genetische Aberrationen auf.

Bei den Meningeomen vom Grad I gelang bei den Tumorsuppressorgen BRCA1 (17q21) und VHL (3p25-26) in jeweils 8 Fällen (80 %) der Nachweis einer Deletion. 4 weitere Deletionen des VHL-Gens konnten bei den Meningeomen vom Grad II und III festgestellt werden.

Der hohe Anteil der Kopienzahlveränderungen des BRCA1-Gens bei Meningeomen ist nicht deckungsgleich mit Ergebnissen von Kirsh *et al.*, die Veränderungen des BRCA1 (17q21) oder des BRCA2-Gens (13q12) in keinem pathogenetischen Zusammenhang mit der Entstehung von Meningeomen sehen (Kirsh *et al.* 1997). Beide Tumorsuppressorgene spielen eine entscheidende Rolle vor allem bei hereditären Formen des Karzinoms der Mamma und des Ovars. Interessanterweise bestätigen verschiedene epidemiologische Studien eine Erhöhung der Inzidenz von Meningeomen bei Patientinnen mit Brustkrebs um den Faktor 1,57 bis 1,90 (Malmer *et al.* 2000, Ashan *et al.* 1995). Die hohe Anzahl der nachgewiesenen Deletionen beider Gene könnte auch Ursache eines systematischen Fehlers im Rahmen der densitometrischen Auswertung sein.

5. 2. 1. 3. Amplifikationen

Mittels vergleichender genomischer Hybridisierung konnte bei Meningeomen vom Grad II und Grad III Amplifikationen von Abschnitten des langen Arms von Chromosom 17 detektiert werden (Weber *et al.* 1997). Bei den im Rahmen dieser Studie untersuchten Meningeomen konnte unter den verwendeten Tumorproben keine Amplifikation des BRCA1-Gens (17q21) nachgewiesen werden. Bei den erfassten Kopienzahlveränderungen in der Gruppe der Meningeome ist das Tumorsuppressorgen IL2 (4q26) am häufigsten amplifiziert. Ein Vergleich mit einer entsprechenden Vergleichsstudie konnte bei geringer Datenlage nicht erhoben werden.

5. 2. 2. Gliome

5. 2. 2. 1. Häufigkeit der Kopienzahlveränderungen

In der Gruppe der Gliome konnten durchschnittlich 8,1 Aberrationen pro Tumor nachgewiesen werden. Die einzelnen Tumoren weisen dabei zwischen 3 und 12 Aberrationen auf (Median 9). Damit sind Gliome gegenüber Meningeomen häufiger von Aberrationen betroffen (Vergleich Tabelle 7). Analog der Ergebnisse der Gruppe der Meningeomen überwiegen Deletionen gegenüber Amplifikationen (5,4 Deletionen vs. 2,7 Amplifikationen je Gliom) (Vergleich Kapitel 4.6.).

5. 2. 2. 2. Deletionen

Bei 5 von 7 untersuchten Gliomen sind Deletionen des VHL-Gens (3p25.3) nachweisbar. Bereits in der Gruppe der Meningeome konnte bei 12 von 15 Tumoren eine Deletion des VHL-Gens nachgewiesen werden. Da weder bei Meningeomen noch Gliomen Veränderungen des VHL-Gens in dem nachgewiesenen Ausmaß bisher beschrieben sind, mag hier ein systematischer Fehler vorliegen.

Die Tumorsuppressorgene CHFR (12q24.33) und PYCARD (16p12) sind bei 3 von 7 (43 %) untersuchten Gliomen deletiert. Mehrere Gene fallen durch Deletionen in 2 von 7 (29 %) Fällen auf (CASR, CDKN2A, CDKN2B, PTEN, PAX6, TSC2, GATA5). Bezüglich des PTEN-Gens stimmen diese Ergebnisse mit Untersuchungen überein, welche bei primären Glioblastomen eine Deletion des PTEN-Gens in 25 % der Fälle nachweisen konnten (Ohgaki 2005). Weitere Untersuchungen bestätigen Kopienzahlveränderungen des PTEN-Gens (10q23) bei 22 % der Glioblastome (Schmidt *et al.* 2002). Auch die nachgewiesenen Deletionen des CDKN2A-Gens werden durch Ergebnisse anderer Studien bestätigt. Veränderungen des CDKN2A-Gens (9p21) wurden erstmals 1994 beschrieben

(Giani und Finocchiari 1994) und spielen eine entscheidende Rolle bei der Progression von sekundären Glioblastomen sowie bei der Entwicklung von de-novo-Glioblastomen (Collins 2004). Untersuchungen an Glioblastomen mittels vergleichender genomischer Hybridisierung (CGH) ergaben im Vergleich zu den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchung neben einer Häufung von Deletionen von Abschnitten der Chromsomen 10 und 9p ein ähnlich heterogenes Bild verschiedener Aberrationen (Wiltshire *et al.* 2000). Zu den weiteren nachgewiesenen Deletionen sind bei allgemein geringer Datenlage keine Kopienzahlanomalien bekannt. Im Gegensatz zu den häufig dokumentierten Veränderungen des p53-Gens (Peraud *et al.* 1997) konnte unter den verwendeten Tumorproben keine Kopienzahlveränderung des betreffenden Gens nachgewiesen werden.

5. 2. 2. 3. Amplifikationen

Auch in der Gruppe der Gliome sind Amplifikationen im Vergleich seltener nachweisbar als Deletionen. Mit 2,7 amplifizierten Genen pro Tumor (Median = 2, Min = 1, Max = 6) ist die durchschnittliche Kopienzahlvermehrung in der Gruppe der Gliome mit den der höhergradigen Meningeome vergleichbar (3,0) (Vergleich Tabelle 6). Mit Kopienzahlvermehrung in jeweils 3 Fällen sind die Tumorsuppressorgene PMP22 (17p12), IL2 (4q26) und CDK6 (7q21.3) am häufigsten amplifiziert. Amplifikationen des Tumorsuppressorgens BCL2 (18q21.3) konnten bei 2 Gliomen nachgewiesen werden. Bei der Betrachtung weiterer Amplifikationen ist keine Häufung bestimmter chromosomaler Abschnitte auffällig.

Bei Glioblastomen ist mit einem Anteil von etwa 40 % das EGFR-Gen (7p12) am häufigsten von Kopienzahlvermehrung betroffen (Ohgaki *et al.* 2004). Bei der vorliegenden Untersuchung wiesen 7 von 7 (100 %) untersuchten Gliome Amplifikationen auf. Da unter den verwendeten Oligonukleotiden keines gegen das EGFR-Gen gerichtet ist und auch keine benachbarte Bande hinsichtlich Kopienzahlveränderungen untersucht wurde, können zu den untersuchten Gliomen keine Aussagen hinsichtlich Amplifikationen des EGFR-Gens getroffen werden. Die nachgewiesenen Amplifikationen der Tumorsuppressorgene PMP22 (17p12), IL2 (4q26), CDK6 (7q21.3) sowie BCL2 (18q21.3) sind bisher nicht aus vergleichbaren Studien bekannt.

5. 2. 3. Intrakranielle Metastasen

5. 2. 3. 1. Häufigkeit der Kopienzahlveränderungen

Mit durchschnittlich 16,7 Aberrationen sind in der Gruppe der intrakraniellen Metastasen im Vergleich zu Meningeomen und Gliomen am häufigsten Kopienzahlveränderungen nachweisbar. Dabei weisen die verschiedenen Tumoren zwischen 9 und 24 Aberrationen auf (Median = 16). Eine vergleichsweise hohe Anzahl von Aberrationen konnte auch in Untersuchungen durch Hart und Easty festgestellt werden, welche die Transformation von Tumorzellen als Ergebnis von zunehmender genetischer Instabilität ansehen (Hart und Easty 1991). Tumorpulationen mit einem hohen Metastasierungspotential weisen gegenüber Tumorproben mit geringem Metastasierungspotential eine Erhöhung der Mutationsrate um den Faktor 3 bis 7 auf (Cifone und Fidler 1981).

Wie in der Tabelle 11 erkennbar, weisen die Aberrationen bei den verschiedenen Tumorproben ein sehr heterogenes Verteilungsmuster auf. Erneut überwiegen Deletionen gegenüber Amplifikationen bei einem Häufigkeitsvergleich der verschiedenen Kopienzahlveränderungen (9,7 Deletionen gegenüber 7 Amplifikationen je Tumor).

5. 2. 3. 2. Deletionen

Mit Deletionen in jeweils 4 Fällen sind die Tumorsuppressorgene VHL (3p26-25), CHFR (12q24.33), PYCARD (16p12) und BRCA1 (17q21) am häufigsten betroffen. Die Tumorsuppressorgene DAPK1 (9q34.1), CREM (10p12.1) und PTEN (10q23.3) sind in jeweils 3 Fällen deletiert. Die detektierten Deletionen des PTEN-Gens (10q23.3) stimmen mit Untersuchungen mittels vergleichender genomischer Hybridisierung überein, die eine Häufung von Deletionen des Abschnitts 10q23-24 bei intrakraniellen Metastasen nachweisen konnten (Petersen *et al.* 2000). Weitere bekannte Deletionen der Abschnitte 4q, 5q, 9p21 und 18q21-22 (Petersen *et al.* 2000) konnten durch einfache Deletionen der Tumorsuppressorgene IL2 (4q), APC (5q), CDKN2A und CDKN2B (9p21) und BCL2 (18q21-22) bestätigt werden.

5. 2. 3. 3. Amplifikationen

Mit durchschnittlich 7 Amplifikationen pro Tumorprobe sind intrakranielle Metastasen deutlich häufiger von Kopienzahlvermehrung betroffen als Meningeome oder Gliome. Der Anstieg der durchschnittlichen Anzahl der Amplifikationen in der Gruppe der Meningeome könnte dabei auch Ausdruck einer zunehmenden genetischen Instabilität sein.

Mit jeweils 4 Amplifikationen sind die Tumorsuppressorgene CDKN1B (12p13.1) und CDK6 (7q21.3) am häufigsten betroffen. Kopienzahlvermehrungen bei jeweils 3 Tumorproben sind

bei den Genen FHIT (3p14.2), IL2 (4q26), CKN2B (9p21), TNFRSF1A (12p13), BCL2 (18q21.3) und TIMP3 (22q12.3) nachweisbar.

Ein Vergleich mit anderen Studien wird erneut durch die Untersuchung unterschiedlicher Loci erschwert. So konnten bei intrakraniellen Metastasen verschiedener solider Tumoren Amplifikationen der Abschnitte 1q23, 7p12, 8q24, 17q24-25 und 20q13 festgestellt werden (Petersen *et al.* 2000). Bei vorliegender Studie konnte nur durch die Untersuchung des Tumorsuppressorgens GATA5 (20q13.33) die Kopienzahl eines korrespondierenden chromosomalen Abschnitts detektiert werden. Dabei konnte mit 2 von 7 Tumorproben eine vergleichbar häufige Amplifikation des Abschnitts nachgewiesen werden.

5. 3. Promotormethylierungen der verschiedenen Entitäten

5. 3. 1. Meningiome

In der Gruppe der benignen Meningeome konnten bei 10 Tumorproben nur insgesamt 2 Promotormethylierungen bei 2 unterschiedlichen Tumoren nachgewiesen werden. Betroffen waren die Gene ESR1 (6q25.1) und WT1 (11p13). Mit insgesamt 2 Methylierungen bei 5 Tumorproben sind in der Gruppe der atypischen und anaplastischen Meningeome Methylierungen geringgradig häufiger nachweisbar. Neben dem Tumorsuppressorgen RASSF1A (3p21.3) ist erneut das Gen WT1 (11p13) betroffen, welches bei selbiger Tumorprobe ebenfalls amplifiziert ist. Untersuchungen durch Liu *et al.* bestätigen eine quantitative Zunahme von Methylierungen bei atypischen und anaplastischen Meningiomen. Ein Vergleich der Häufigkeit der epigenetischen Veränderung wird durch die geringe Anzahl der zur Verfügung stehenden Meningeome des Malignitätsgrades II und III erschwert. Die dabei mit 32 % (Grad II) bzw. 54 % (Grad III) häufigste Methylierung des Tumorsuppressorgens GSTP1 (11q13.2) (Liu *et al.* 2005) ist bei keinem der 5 höhergradigen untersuchten Meningeome nachweisbar.

Der Methylierungsstatus der Gene RASSF1 und WT1 wurden in der o. g. Studie nicht berücksichtigt.

5. 3. 2. Gliome

In der Gruppe der Gliome konnten bei allen untersuchten Tumorproben Methylierungen festgestellt werden. Mit insgesamt 16 Methylierungen bei 7 Gliomen (Median = 2, Min = 1, Max = 6) sind analog der Kopienzahlveränderungen, Promotormethylierungen bei Gliomen häufiger nachweisbar als bei Meningeomen.

Besonders hervorstechend ist dabei das Gen RASSF1 (3p21.3), dessen Promoterregion bei 6 von 7 Gliomen (86 %) Methylierungen aufweist. Dieses Ergebnis wird bestätigt von Untersuchungen, bei denen Methylierungen des RASSF1-Gens sowohl bei Medulloblastomen und Neuroblastomen als auch bei Glioblastomen nachgewiesen wurden (Pfeifer und Dammann 2004). Darüber hinaus gelang bei 50 % der Patienten mit Glioblastomen, bei denen Methylierungen des RASSF1 Gens innerhalb des Tumorgewebes nachgewiesen werden konnte, auch ein Nachweis der Methylierung im Serum (Ramirez *et al.* 2003), was die Bedeutung einer Erfassung des Methylierungsstatus unterstreicht.

Des Weiteren sind Promotormethylierungen des Tumorsuppressorgens WT1 (11p13) bei 3 von 7 Gliomen (43 %) nachweisbar. Die Gene CASP8 (2q33-q34) und PYCARD (16p12) weisen bei jeweils 2 von 7 Gliomen (29 %) Promotormethylierungen auf. Die nachgewiesene Methylierung des Tumorsuppressorgens CASP8 wird durch Untersuchungen bekräftigt, die einer Methylierung von CASP8 eine entscheidende Rolle bei der Progression von Rezidiven bei Glioblastomen zuschreiben (Martinez *et al.* 2007). Das Tumorsuppressorgen PYCARD (16p12) weist bei einer Tumorable sowohl eine Promotormethylierung als auch eine Deletion auf, sodass in diesem Fall ein bialleler Funktionsverlust möglich ist.

5. 3. 3. Intrakranielle Metastasen

In der Gruppe der intrakraniellen Metastasen konnten ebenfalls bei allen untersuchten Tumoren Methylierungen einzelner oder mehrerer Tumorsuppressorgene nachgewiesen werden. Mit 24 Methylierungen bei 7 Tumoren (Median = 2, Min = 1, Max = 8) sind im Vergleich zu Meningeomen und Gliomen in der Gruppe der intrakraniellen Metastasen Promotormethylierungen am häufigsten nachweisbar (Vergleich Tabelle 8). Wie bereits in der Gruppe der Gliome ist das RASSF1A-Gen (3p21.3) am häufigsten von Promotormethylierungen betroffen (5 von 7 Tumoren / 71 %). Bei 6 weiteren Genen konnten in jeweils 2 Fällen (29 %) Promotormethylierungen nachgewiesen werden: ESR1 (6q25.1), CD44 (11p12), WT1 (11p13), CHFR (12q24.33), CDH13 (16q24.2) und GATA5 (20q13.3). Das Tumorsuppressorgen RASSF1A ist bei einer Tumorable sowohl deletiert, als auch von einer Promotormethylierung betroffen, sodass erneut die Möglichkeit eines biallelen Funktionsverlustes besteht. Vergleiche mit Ergebnissen von Untersuchungen können aufgrund der verwendeten Oligonukleotide nur für die Gene GSTP1 (33 %), MGMT (39 %), THBS-1 (56 %), TP53 (11 %), TIMP3 (22 %) und TP73 (22 %) erfolgen (Gonzalez-Gomez *et al.* 2003). Von den entsprechenden Genen wiesen einzig GSTP1 und MGMT bei jeweils einer Tumorable eine Methylierung auf (14 %).

5. 4. Möglichkeiten und Grenzen des MLPA-Verfahrens

Analog zu Methoden wie vergleichender genomischer Hybridisierung (CGH) oder dem Nachweis von heterozygoten Verlusten von Mikrosatelliten-DNS (LOH) bietet das MLPA-Verfahren den Vorteil einer direkten Untersuchung von Tumormaterial. Im Vergleich dazu stößt z.B. die klassische Karyotypisierung aufgrund der schwierigen Präparation von Metaphase-Chromosomen bei der Untersuchung genetischer Aberrationen solider Tumoren auf methodische Grenzen (Gray und Collins 2000). Durch die direkte Untersuchung von Tumormaterial kann auch auf die mitunter schwierige Anzüchtung einzelner Tumor-Zelllinien verzichtet werden. Bei der direkten Untersuchung von Tumorgewebe ist von Nachteil, dass nicht-tumoröse Zellen die Untersuchungsergebnisse beeinflussen können. Beträgt der Anteil nicht-tumoröser Zellen $> 75\%$ der Gewebeprobe, sind einzelne numerischer Aberrationen z.B. mittels vergleichender genomischer Hybridisierung nicht detektierbar (Weiss *et al.* 1999). Durch zusätzliche Mirkodissektion oder *Cell Sorting* kann der Einfluss von z.B. Stroma-, Blut-, Epithel- oder Entzündungszellen minimiert werden. Da für die vorliegende Studie nur Gewebeproben mit einem Tumoranteil von $> 50\%$ verwendet wurden, konnte auf diese aufwendigen Verfahren verzichtet werden. Darüber hinaus konnte nach DNS-Extraktion durch Gelelektrophorese eine hohe Qualität der DNS festgestellt werden, was eine Beeinflussung der Untersuchungsergebnisse durch Fragmentierung oder Verwendung einer unzureichenden Menge an DNS minimiert (Vergleich Kapitel 4.2).

Wie auch bei der vergleichenden genomischen Hybridisierung (CGH) müssen bei dem verwendeten MLPA-Verfahren Tumorprobe und Referenz-DNS nicht von einer Testperson stammen. Dies ist besonders vorteilhaft, wenn von der untersuchten Patientenpopulation keine Blutproben vorhanden sind, um Referenz-DNS, z.B. aus peripheren Lymphozyten, zu gewinnen. Dabei können allerdings genetische Aberrationen der Referenz-DNS ohne pathologisches Korrelat, z.B. polymorphe Amplifikationen bzw. Deletionen einzelner Gene (Wong *et al.* 2007), die Auswertung der Signalstärke der Bandensignale der Tumor-DNS beeinflussen und zu einer fehlerhaften Detektion von Aberrationen führen. Diese Kopienzahlvariationen sind genom-weit vertreten (Conrad *et al.* 2006, Hinds *et al.* 2006, Iafrate *et al.* 2004, Sebat *et al.* 2004). Untersuchungen zu Kopienzahlveränderungen bei verschiedenen Krankheitsbildern sollten daher auch im Kontext zu regulären Kopienzahlvariationen betrachtet werden, die die Auswertung der Ergebnisse beeinflussen können (Wong *et al.* 2007). Das könnte zutreffend sein für den häufigen Nachweis einer Deletion der Gene VHL (3p26-25) und BRCA1 (17q21) innerhalb der hier untersuchten Tumorproben. Eine mögliche Amplifikation der Gene innerhalb der Referenz-DNS kann bei

mäßig verminderter Signalstärke der Gene innerhalb der Tumor-DNS eine Deletion anzeigen. Diese Veränderungen der Kopienzahl der Gene können sowohl in der Kontrollprobe als auch Tumorprobe ohne phänotypisches Korrelat bzw. Krankheitswert in Erscheinung treten (Wong *et al.* 2007).

5. 5. Ausblick

Neben molekularbiologischen Erkenntnissen hinsichtlich der Ätiologie und Progression von Tumoren könnte besonders die Erfassung des Methylierungsstatus zukünftig eine Bedeutung in der Therapie von malignen Tumoren spielen. Neue Chemotherapeutika wie 5-Aza-2'-Deoxycytidin können die Expression von der methylierten Gene durch Hemmung der DNS-Methyltransferase reaktivieren (Pfeifer und Dammann 2004). Eine weitere Möglichkeit besteht in der Verwendung von Antisense-Oligonukleotiden, die die mRNA der DNS-Methyltransferase beeinflussen und somit die Biosynthese des Enzyms verhindern (Leu *et al.* 2003). Aufgrund der zunehmenden klinischen Relevanz hinsichtlich möglicher Therapiestrategien sollte besonders die Erfassung des Methylierungsstatus Mittelpunkt weiterführender Untersuchungen sein. In Abhängigkeit von der Tumorentität könnte dabei eine entsprechende Vielzahl von MLPA-Proben die gesamte Promotorregion spezifischer Gene erfassen. Da der Methylierungsstatus von z.B. Glioblastomen in begrenztem Maße auch im Serum erfassbar ist, könnte bei einer weiteren Verbesserung der Methodik die Wirksamkeit spezifischer Chemotherapeutika anhand des Methylierungsstatus auch mit Hilfe von Blutproben eingeschätzt werden (Pfeifer und Dammann 2004).

6. Schlussfolgerungen

Die in vorliegender Studie mit Hilfe des MS-MLPA-Verfahrens detektierten genetischen und epigenetischen Aberrationen weisen einen quantitativen Zusammenhang mit dem Malignitätsgrad der untersuchten Tumorproben auf. Dabei weisen Tumoren höherer Malignität (Gliome und intrakranielle Metastasen) deutlich mehr Aberrationen und Promotormethylierungen als Tumoren eines niedrigeren Malignitätsgrades (Meningeome).

Insgesamt konnten deutlich mehr Deletionen (176) als Amplifikationen (97) nachgewiesen werden. Dies spricht für die Aussagekraft der Untersuchungsmethode, richteten sich die verwendeten MLPA-Proben doch gegen Promotoren von Tumorsuppressorgenen, welche im Vergleich zu Onkogenen in malignen Tumoren eine verminderte Aktivität aufweisen bzw. häufig von Aberrationen betroffen sind (Poremba et al. 1999).

Der häufigere Nachweis von Amplifikationen von Tumorsuppressorgenen bei Tumoren hoher Malignität könnte dabei auch als Ausdruck einer hohen genetischen Instabilität angesehen werden, ohne dass die einzelnen Veränderungen einen direkten Einfluss auf das biologische Verhalten des Tumors besitzen.

Analog der nachgewiesenen Kopienzahlveränderungen kann ein quantitativer Anstieg der Promotormethylierungen bei Tumoren höherer Malignität nachgewiesen werden.

Abschließend ist festzuhalten, dass das MS-MLPA-Verfahren eine schnelle, unkomplizierte und kostengünstige Methode zur Erfassung von Kopienzahlveränderungen und Methylierungen ist, die im Vergleich zu herkömmlichen Methoden weniger aufwendig ist und aufgrund der PCR-basierten Methodik eine hohe Spezifität aufweist. Darüber hinaus eignet sich das Verfahren hervorragend zur Erfassung von Kopienzahlveränderungen und Methylierung bei soliden Tumoren in einem multiplexen Studiendesign. Weitere Untersuchungen im Rahmen der Tumorforschung sollten besonders im Hinblick auf die genaue Charakterisierung von tumorspezifischen Aberrationen erfolgen.

7. Literatur- und Quellenverzeichnis

- Ahn J, Ogilvie C, Welch A, Thomas H, Madula R, Hills A, Donaghue C, Mann K. 2007. Detection of subtelomere imbalance using MLPA: validation, development of analysis protocol, and application in a diagnostic centre. *BMC Medical Genetics* 2007;8:9.
- Ahsan H, Neugut AI, Bruce J. 1995. Association of malignant brain tumors and cancers of other sites. *J Clin Oncol.* 13: 2931-5.
- Bailey P, Cushing H. A classification of tumours of the glioma group on a histogenetic basis with a correlated study of prognosis. Philadelphia: JB Lippincott, 1926.
- Barbanti-Brodano G, Pagnani M, Viadana P, Beth-Giraldo E, Giraldo G, Corallini A. 1987. BK virus DNA in Kaposi's sarcoma. *Antibiot Chemother*, 38:113-120.
- Baylin SB. 2005. DNA methylation and gene silencing in cancer. *Nat Clin Pract Oncol*, 2 Suppl 1:S4-11.
- Bello MJ, de Campos JM, Kusak ME, Vaquero J, Sarasa JL, Pestana A, Rey JA. 1994. Allelic loss at 1p is associated with tumor progression of meningiomas. *Genes Chromosomes Cancer*, 9 (4):296-298.
- Bird A. 2002. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*, 16 (1):6-21.
- Boing C. C.: Cancer Statistics 1993. *CA Cancer J Clin* 43 (1993) 7.
- Bondy M, Ligon BL. 1996. Epidemiology and etiology of intracranial meningiomas: a review. *J Neurooncol*, 29 (3):197-205.
- Bostrom J, Meyer-Puttlitz B, Wolter M, Blaschke B, Weber RG, Lichter P, Ichimura K, Collins VP, Reifenberger G. 2001. Alterations of the tumor suppressor genes CDKN2A (p16(INK4a)), p14(ARF), CDKN2B (p15(INK4b)), and CDKN2C (p18(INK4c)) in atypical and anaplastic meningiomas. *Am J Pathol*, 159 (2):661-669.
- Bridges CB. 1917. Deficiency. *Genetics*, 2 (5):445-465.
- Brison, O. 1993. Gene amplification and tumor progression. *Biochim Biophys Acta* 1155(1): 25-41.
- Cifone MA, Fidler IJ. 1981. Increasing metastatic potential is associated with increasing genetic instability of clones isolated from murine neoplasms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78 (11):6949-6952.
- Collins VP. 2004. Brain tumours: classification and genes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 75 Suppl 2:ii2-11.
- Conrad, D. F., T. D. Andrews, et al. 2006. A high-resolution survey of deletion polymorphism in the human genome. *Nat Genet* 38(1): 75-81.

- Dirven, C. M., V. W. van Beusechem, et al. 2002. Oncolytic adenoviruses for treatment of brain tumours. *Expert Opin Biol Ther* 2(8): 943-52.
- Dumanski JP, Rouleau GA, Nordenskjold M, Collins VP. 1990. Molecular genetic analysis of chromosome 22 in 81 cases of meningioma. *Cancer Res*, 50 (18):5863-5867.
- Fero ML, Randel E, Gurley KE, Roberts JM, Kemp CJ. 1998. The murine gene p27Kip1 is haplo-insufficient for tumour suppression. *Nature*, 396 (6707):177-180.
- Fine HA. 1994. Brain tumor chemotherapy trials: slow start, but quickly gaining. *J Clin Oncol*, 12 (10):2003-2004.
- Fleischman E. W., S. Reshmi, et al. 1999. Increased karyotype precision using fluorescence in situ hybridization and spectral karyotyping in patients with myeloid malignancies. *Cancer Genet Cytogenet* 108(2): 166-70.
- Friend SH, Bernards R, Rogelj S, Weinberg RA, Rapaport JM, Albert DM, Dryja TP. 1986. A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature*, 323 (6089):643-646.
- Gaspar LE, Scott C, Murray K, Curran W. 2000. Validation of the RTOG recursive partitioning analysis (RPA) classification for brain metastases. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 47 (4):1001-1006.
- Goldstein AM. 2004. Familial melanoma, pancreatic cancer and germline CDKN2A mutations. *Hum Mutat*, 23 (6):630.
- Gonzalez-Gomez P, Bello MJ, Arjona D, Alonso ME, Lomas J, Aminosos C, de Campos JM, Sarasa JL, Gutierrez M, Rey JA. 2003. CpG island methylation of tumor-related genes in three primary central nervous system lymphomas in immunocompetent patients. *Cancer Genet Cytogenet*, 142 (1):21-24.
- Gonzalez-Gomez P, Bello MJ, Alonso ME, Lomas J, Arjona D, Aminosos C, De Campos JM, Isla A, Gutierrez M, Rey JA. 2003. Frequent death-associated protein-kinase promoter hypermethylation in brain metastases of solid tumors. *Oncol Rep*, 10 (4):1031-1033.
- Gonzalez-Gomez P, Bello MJ, Alonso ME, Aminosos C, Lopez-Marin I, De Campos JM, Isla A, Gutierrez M, Rey JA. 2004. Promoter methylation status of multiple genes in brain metastases of solid tumors. *Int J Mol Med*, 13 (1):93-98.
- Gray, J. W. and C. Collins 2000. Genome changes and gene expression in human solid tumors. *Carcinogenesis* 21(3): 443-52.
- Guimaraes DP, Hainaut P. 2002. TP53: a key gene in human cancer. *Biochimie*, 84 (1):83-93.

- Gutmann DH, Giordano MJ, Fishback AS, Guha A. 1997. Loss of merlin expression in sporadic meningiomas, ependymomas and schwannomas. *Neurology*, 49 (1):267-270.
- Hahn, P. J. 1993. Molecular biology of double-minute chromosomes. *Bioessays* 15(7): 477-84.
- Hainaut P, Hollstein M. 2000. p53 and human cancer: the first ten thousand mutations. *Adv Cancer Res*, 77:81-137.
- Hall JM, Lee MK, Newman B, Morrow JE, Anderson LA, Huey B, King MC. 1990. Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science*, 250 (4988):1684-1689.
- Harbour JW, Dean DC. 2000. The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev*, 14 (19):2393-2409.
- Hart IR, Easty D. 1991. Tumor cell progression and differentiation in metastasis. *Semin Cancer Biol*, 2 (2):87-95.
- Herman JG, Baylin SB. 2003. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med*, 349 (21):2042-2054.
- Hinds, D. A., A. P. Klok, et al. 2006. Common deletions and SNPs are in linkage disequilibrium in the human genome. *Nat Genet* 38(1): 82-5.
- Iafrate, A. J., L. Feuk, et al. 2004. Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat Genet* 36(9): 949-51.
- Ibelgaufts H, Jones KW. 1982. Papovavirus-related RNA sequences in human neurogenic tumours. *Acta Neuropathol (Berl)*, 56 (2):118-122.
- Ibelgaufts H, Jones KW, Maitland N, Shaw JF. 1982. Adenovirus-related RNA sequences in human neurogenic tumours. *Acta Neuropathol (Berl)*, 56 (2):113-117.
- Ikeda, K., Y. Saeki, et al. 1999. Inhibition of NF2-negative and NF2-positive primary human meningioma cell proliferation by overexpression of merlin due to vector-mediated gene transfer. *J Neurosurg* 91(1): 85-92.
- Iliakis G, Wang H, Perrault AR, Boecker W, Rosidi B, Windhofer F, Wu W, Guan J, Terzoudi G, Pantelias G. 2004. Mechanisms of DNA double strand break repair and chromosome aberration formation. *Cytogenetic Genome Research* 104: 14-20.
- Inbal B, Cohen O, Polak-Charcon S, Kopolovic J, Vadai E, Eisenbach L, Kimchi A. 1997. DAP kinase links the control of apoptosis to metastasis. *Nature*, 390 (6656):180-184.
- Jeuken J, Cornelissen S, Boots-Sprenger S, Gijzen S, Wesseling P. 2006. Multiplex ligation-dependent probe amplification: a diagnostic tool for simultaneous identification of different genetic markers in glial tumors. *J Mol Diagn*, 8 (4):433-443.

- Jones PA, Baylin SB. 2002. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet*, 3 (6):415-428.
- Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Piper J, Isola J, Waldman FM, Gray JW, Pinkel D. 1994. Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes Chromosomes Cancer*, 10 (4):231-243.
- Kamb A, Shattuck-Eidens D, Eeles R, Liu Q, Gruis NA, Ding W, Hussey C, Tran T, Miki Y, Weaver-Feldhaus J, et al. 1994. Analysis of the p16 gene (CDKN2) as a candidate for the chromosome 9p melanoma susceptibility locus. *Nat Genet*, 8 (1):23-26.
- Kim J, Lee S, Rhee C, Park S, Lee J 1998. Loss of heterozygosity on chromosome 22q and 17p correlates with aggressiveness of meningiomas. *Journal of Neuro-Oncology* 40 :101-106.
- Kirsh M, Zhu JJ, Black PM. 1997. Analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in sporadic meningiomas. *Genes Chromosom Cancer*. 20: 53-9.
- Kleihues P, Cavenee WK (1997) Pathology and genetics of tumours of the nervous system. Published by the International Agency for Research on Cancer, Lyon.
- Kleihues P, Schauble B, zur Hausen A, Esteve J, Ohgaki H. 1997. Tumors associated with p53 germline mutations: a synopsis of 91 families. *Am J Pathol*, 150 (1):1-13.
- Knudson AG, Jr. 1971. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 68 (4):820-823.
- Knudson AG, Jr., Meadows AT, Nichols WW, Hill R. 1976. Chromosomal deletion and retinoblastoma. *N Engl J Med*, 295 (20):1120-1123.
- Kuratsu J, Ushio Y. 1996. Epidemiological study of primary intracranial tumors: a regional survey in Kumamoto Prefecture in the southern part of Japan. *J Neurosurg*, 84 (6):946-950.
- Kuratsu J, Ushio Y. 1997. Epidemiological study of primary intracranial tumours in elderly people. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 63 (1):116-118.
- Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA. 1998. Cancer statistics, 1998. *CA Cancer J Clin*, 48 (1):6-29.
- Langford AL 1996. Pathology of meningiomas. *Journal of Neuro-Oncology*, 29; 217-221.
- Lee JY, Finkelstein S, Hamilton RL, Rekha R, King JT, Jr., Omalu B. 2004. Loss of heterozygosity analysis of benign, atypical, and anaplastic meningiomas. *Neurosurgery*, 55 (5):1163-1173.
- Lengauer, C., Kinzler, K. W. Kinzler, et al. 1998. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396(6712): 643-9.

- Liu Y, Pang JC, Dong S, Mao B, Poon WS, Ng HK. 2005. Aberrant CpG island hypermethylation profile is associated with atypical and anaplastic meningiomas. *Hum Pathol*, 36 (4):416-425.
- Lloyd BH, Platt-Higgins A, Rudland PS, Barraclough R. 1998. Human S100A4 (p9Ka) induces the metastatic phenotype upon benign tumour cells. *Oncogene*, 17 (4):465-473.
- Lo, A. W., L. Sabatier, et al. 2002. DNA amplification by breakage/fusion/bridge cycles initiated by spontaneous telomere loss in a human cancer cell line. *Neoplasia* 4(6): 531-8.
- Longstreth WT, Jr., Dennis LK, McGuire VM, Drangsholt MT, Koepsell TD. 1993. Epidemiology of intracranial meningioma. *Cancer*, 72 (3):639-648.
- Luczak M and Jagodzinski P. 2006. The role of DNA methylation in cancer development. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 44 (3): 143-154.
- Lupski J. 2004. Hotspots of homologous recombination in the human genome: not all homologous sequences are equal. *Genome Biology* 2004. 5: 242
- Malmer B, Tavelin B, Hendrikson R, Grönberg H. 2000. Primary brain tumors as secondary primary: a novel association between meningioma and colorectal cancer. *Int J Cancer* 85: 78-81.
- Marchetti D, Denkins Y, Reiland J, Greiter-Wilke A, Galjour J, Murry B, Blust J, Roy M. 2003. Brain-metastatic melanoma: a neurotrophic perspective. *Pathol Oncol Res*, 9 (3):147-158.
- Martinez R, Setien F, Voelter C, Casado S, Quesada MP, Schackert G, Esteller M. 2007. CpG island promoter hypermethylation of the pro-apoptotic gene caspase-8 is a common hallmark of relapsed glioblastoma multiforme. *Carcinogenesis*, 28 (6):1264-1268.
- Martinez-Glez V, Franco-Hernandez C, Lomas J, Pena-Granero C, de Campos JM, Isla A, Rey JA. 2007. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) screening in meningioma. *Cancer Genet Cytogenet*, 173 (2):170-172.
- McClintock, B. 1941. The Stability of Broken Ends of Chromosomes in *Zea Mays*. *Genetics* 26(2): 234-82.
- McCutcheon IE. 1996. The biology of meningiomas. *J Neurooncol*, 29 (3):207-216.
- Memon, M. Y. 1980. Multiple and familial meningiomas without evidence of neurofibromatosis. *Neurosurgery* 7(3): 262-4.
- Mills AA, Zheng B, Wang XJ, Vogel H, Roop DR, Bradley A. 1999. p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. *Nature*, 398 (6729):708-713.

- Nakagawa H, Kimura S, Kubo S, Fujita T, Tsuruzono K, Hayakawa T. 1992. Prognostic factors in patients surviving for more than 1 or 5 years after removal of metastatic brain tumors. *Neurol Med Chir (Tokyo)*, 32 (13):947-951.
- Neuhausen SL, Marshall CJ. 1994. Loss of heterozygosity in familial tumors from three BRCA1-linked kindreds. *Cancer Res*, 54 (23):6069-6072.
- Nevins JR. 2001. The Rb/E2F pathway and cancer. *Hum Mol Genet*, 10 (7):699-703.
- Nobori T, Miura K, Wu DJ, Lois A, Takabayashi K, Carson DA. 1994. Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature*, 368 (6473):753-756.
- Norden AD, Wen PY, Kesari S. 2005. Brain metastases. *Curr Opin Neurol*, 18 (6):654-661.
- Nygren AO, Ameziane N, Duarte HM, Vijzelaar RN, Waisfisz Q, Hess CJ, Schouten JP, Errami A. 2005. Methylation-specific MLPA (MS-MLPA): simultaneous detection of CpG methylation and copy number changes of up to 40 sequences. *Nucleic Acids Res*, 33 (14):e128.
- Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre PL, Burkhard C, Schuler D, Probst-Hensch NM, Maiorka PC, Baeza N, Pisani P, Yonekawa Y, Yasargil MG, Lutolf UM, Kleihues P. 2004. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res*, 64 (19):6892-6899.
- Ohgaki H, Kleihues P. 2005. Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol (Berl)*, 109 (1):93-108.
- Olivier M, Eeles R, Hollstein M, Khan MA, Harris CC, Hainaut P. 2002. The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users. *Hum Mutat*, 19 (6):607-614.
- Patchell RA. 2003. The management of brain metastases. *Cancer Treat Rev*, 29 (6):533-540.
- Pastwa, E. and J. Blasiak 2003. Non-homologous DNA end joining. *Acta Biochim Pol* 50(4): 891-908.
- Payne SR, Kemp CJ. 2005. Tumor suppressor genetics. *Carcinogenesis*, 26 (12):2031-2045.
- Peraud A, Watanabe K, Plate KH, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. 1997. p53 mutations versus EGF receptor expression in giant cell glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol*, 56 (11):1236-1241.
- Perry A, Stafford SL, Scheithauer BW, Suman VJ, Lohse CM. 1997. Meningioma grading: an analysis of histologic parameters. *Am J Surg Pathol*, 21 (12):1455-1465.

- Petersen I, Hidalgo A, Petersen S, Schluns K, Schewe C, Pacyna-Gengelbach M, Goeze A, Krebber B, Knosel T, Kaufmann O, Szymas J, von Deimling A. 2000. Chromosomal imbalances in brain metastases of solid tumors. *Brain Pathol*, 10 (3):395-401.
- Petrij-Bosch A, Peelen T, van Vliet M, van Eijk R, Olmer R, Drusedau M, Hogervorst F, Hageman S, Arts P, Ligtenberg M et al. 1997. BRCA1 genomic deletions are major founder mutations in Dutch breast cancer patients. *Nature Genetics*. 17: 341-345.
- Pfeifer, G. P. and R. Dammann 2004. Methylation of the tumor suppressor gene RASSF1A in human tumors. *Biochemistry (Mosc)* 70(5): 576-83.
- Pfisterer WK, Hank NC, Preul MC, Hendricks WP, Pueschel J, Coons SW, Scheck AC. 2004. Diagnostic and prognostic significance of genetic regional heterogeneity in meningiomas. *Neuro Oncol*, 6 (4):290-299.
- Pietsch T. Kapitel Hirntumoren in Nicht-hereditäre Tumorerkrankungen, Ganten D und Ruckpaul K (Hrsg.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2002.
- Plotkin SR, Wen PY. 2003. Neurologic complications of cancer therapy. *Neurol Clin*, 21 (1):279-318, x.
- Ponta H, Sleeman J, Herrlich P. 1994. Tumor metastasis formation: cell-surface proteins confer metastasis-promoting or -suppressing properties. *Biochim Biophys Acta*, 1198 (1):1-10.
- Poremba C, Simon R, Boecker W, Dockhorn-Dworniczak B. 1999. Molekulare Ursachen der Tumorentstehung *Onkologie* 1999 5: 847-854.
- Preston-Martin S, Lewis S, Winkelmann R, Borman B, Auld J, Pearce N. 1993. Descriptive epidemiology of primary cancer of the brain, cranial nerves, and cranial meninges in New Zealand, 1948-88. *Cancer Causes Control*, 4 (6):529-538.
- Radhakrishnan K, Mokri B, Parisi JE, O'Fallon WM, Sunku J, Kurland LT. 1995. The trends in incidence of primary brain tumors in the population of Rochester, Minnesota. *Ann Neurol*, 37 (1):67-73.
- Radner H, Blumcke I, Reifenberger G, Wiestler OD. 2002. [The new WHO classification of tumors of the nervous system 2000. *Pathology and genetics*]. *Pathologie*, 23 (4):260-283.
- Ragel BT, Jensen RL. 2005. Molecular genetics of meningiomas. *Neurosurg Focus*, 19 (5):E9.
- Rahman N, Stratton MR. 1998. The genetics of breast cancer susceptibility. *Annu Rev Genet*, 32:95-121.
- Ramaswamy S, Golub TR. 2002. DNA microarrays in clinical oncology. *J Clin Oncol*, 20 (7):1932-1941.

- Ramirez, J. L., M. Taron, et al. 2003. Serum DNA as a tool for cancer patient management. *Rocz Akad Med Bialymst* 48: 34-41.
- Roetger A, Merschjann A, Dittmar T, Jackisch C, Barnekow A, Brandt B. 1998. Selection of potentially metastatic subpopulations expressing c-erbB-2 from breast cancer tissue by use of an extravasation model. *Am J Pathol*, 153 (6):1797-1806.
- Rohringer M, Sutherland GR, Louw DF, Sima AA. 1989. Incidence and clinicopathological features of meningioma. *J Neurosurg*, 71 (5 Pt 1):665-672.
- Ron E, Modan B, Boice JD, Jr., Alfandary E, Stovall M, Chetrit A, Katz L. 1988. Tumors of the brain and nervous system after radiotherapy in childhood. *N Engl J Med*, 319 (16):1033-1039.
- Rosen EM, Fan S, Pestell RG, Goldberg ID. 2003. BRCA1 gene in breast cancer. *J Cell Physiol*, 196 (1):19-41.
- Rowley, J. D. 1998. The critical role of chromosome translocations in human leukemias. *Annu Rev Genet* 32: 495-519.
- Rutledge MH, Sarrazin J, Rangaratnam S, Phelan CM, Twist E, Merel P, Delattre O, Thomas G, Nordenskjold M, Collins VP, *et al.* 1994. Evidence for the complete inactivation of the NF2 gene in the majority of sporadic meningiomas. *Nat Genet*, 6 (2):180-184.
- Sahar, A. 1965. Familial occurrence of meningiomas. Case report. *J Neurosurg* 23(4): 444-5.
- Schmidt MC, Antweiler S, Urban N, Mueller W, Kuklik A, Meyer-Puttlitz B, Wiestler OD, Louis DN, Fimmers R, von Deimling A. 2002. Impact of genotype and morphology on the prognosis of glioblastoma. *J Neuropathol Exp Neurol*, 61 (4):321-328.
- Schouten J, McElgunn C, Waaijer R, Zwiijnenburg D, Diepvens F, Pals G. 2002. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acid Research*. Vol. 30. No. 12 e57.
- Schouten J et al. 2007. MLPA DNA Detection /Quantification Protocol. Version 19.
- Schwab, M. 1999. Oncogene amplification in solid tumors. *Semin Cancer Biol* 9(4): 319-25.
- Sebat, J., B. Lakshmi, et al. 2004. Large-scale copy number polymorphism in the human genome. *Science* 305(5683): 525-8.
- Sedzimir, C. B., A. K. Frazer, et al. 1973. Cranial and spinal meningiomas in a pair of identical twin boys. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 36(3): 368-76.
- Sellner LN, Taylor GR. 2004. MLPA and MAPH: new techniques for detection of gene deletions. *Hum Mutat*, 23 (5):413-419.

- Serrano M, Hannon GJ, Beach D. 1993. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature*, 366 (6456):704-707.
- Sherr CJ. 2004. Principles of tumor suppression. *Cell*, 116 (2):235-246.
- Smith SA, Easton DF, Evans DG, Ponder BA. 1992. Allele losses in the region 17q12-21 in familial breast and ovarian cancer involve the wild-type chromosome. *Nat Genet*, 2 (2):128-131.
- Stark AM, Tscheslog H, Buhl R, Held-Feindt J, Mehdorn HM. 2005. Surgical treatment for brain metastases: prognostic factors and survival in 177 patients. *Neurosurg Rev*, 28 (2):115-119.
- Steiner HH, Herold-Mende C, Bonsanto M, Geletneky K, Kunze S. 1998. [Prognosis of brain tumors: epidemiology, survival time and clinical course]. *Versicherungsmedizin*, 50 (5):173-179.
- Teixeira MR. 2002. Combined classical and molecular cytogenetic analysis of cancer. *Eur J Cancer*, 38 (12):1580-1584.
- Tomlinson, I. P., M. B. Lambros, et al. 2002. Loss of heterozygosity analysis: practically and conceptually flawed? *Genes Chromosomes Cancer* 34(4): 349-53.
- Torp SH, Helseth E, Ryan L, Stolan S, Dalen A, Unsgaard G. 1992. Expression of the epidermal growth factor receptor gene in human brain metastases. *APMIS*, 100 (8):713-719.
- Trimarchi JM, Lees JA. 2002. Sibling rivalry in the E2F family. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3 (1):11-20.
- Ueki, K., C. Wen-Bin, et al. 1999. Tight association of loss of merlin expression with loss of heterozygosity at chromosome 22q in sporadic meningiomas. *Cancer Res* 59(23): 5995-8.
- Venkatachalam S, Shi YP, Jones SN, Vogel H, Bradley A, Pinkel D, Donehower LA. 1998. Retention of wild-type p53 in tumors from p53 heterozygous mice: reduction of p53 dosage can promote cancer formation. *EMBO J*, 17 (16):4657-4667.
- Vogelstein B, Kinzler KW. 1993. The multistep nature of cancer. *Trends Genet*, 9 (4):138-141.
- Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. 2000. Surfing the p53 network. *Nature*, 408 (6810):307-310.
- Walker AE, Robins M, Weinfeld FD. 1985. Epidemiology of brain tumors: the national survey of intracranial neoplasms. *Neurology*, 35 (2):219-226.

- Weber RG, Bostrom J, Wolter M, Baudis M, Collins VP, Reifenberger G, Lichter P. 1997. Analysis of genomic alterations in benign, atypical, and anaplastic meningiomas: toward a genetic model of meningioma progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94 (26):14719-14724.
- Weinberg RA. 1995. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*, 81 (3):323-330.
- Weiss, M. M., M. A. Hermsen, et al. 1999. Comparative genomic hybridisation. *Mol Pathol* 52(5): 243-51.
- Wellenreuther R, Kraus JA, Lenartz D, Menon AG, Schramm J, Louis DN, Ramesh V, Gusella JF, Wiestler OD, von Deimling A. 1995. Analysis of the neurofibromatosis 2 gene reveals molecular variants of meningioma. *Am J Pathol*, 146 (4):827-832.
- Wen PY, Loeffler JS. 2000. Brain metastases. *Curr Treat Options Oncol*, 1 (5):447-458.
- Wijnen, J., H. van der Klift, et al. 1998. MSH2 genomic deletions are a frequent cause of HNPCC. *Nat Genet* 20(4): 326-8.
- Wiltshire RN, Herndon JE, 2nd, Lloyd A, Friedman HS, Bigner DD, Bigner SH, McLendon RE. 2004. Comparative genomic hybridization analysis of astrocytomas: prognostic and diagnostic implications. *J Mol Diagn*, 6 (3):166-179.
- Wong, K. K., R. J. deLeeuw, et al. 2007. A comprehensive analysis of common copy-number variations in the human genome. *Am J Hum Genet* 80(1): 91-104.
- Wooster R, Neuhausen SL, Mangion J, Quirk Y, Ford D, Collins N, Nguyen K, Seal S, Tran T, Averill D, *et al.* 1994. Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. *Science*, 265 (5181):2088-2090.
- Wooster R, Bignell G, Lancaster J, Swift S, Seal S, Mangion J, Collins N, Gregory S, Gumbs C, Micklem G. 1995. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature*, 378 (6559):789-792.
- Wronski M, Wronski J. 1985. [First aid and transportation of patients with cranio-cerebral injuries]. *Pol Tyg Lek*, 40 (19):558-560.
- Yoshida K, Miki Y. 2004. Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. *Cancer Sci*, 95 (11):866-871.
- Zang KD. 2001. Meningioma: a cytogenetic model of a complex benign human tumor, including data on 394 karyotyped cases. *Cytogenet Cell Genet*, 93 (3-4):207-220.
- Zhang Y, Xiong Y, Yarbrough WG. 1998. ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. *Cell*, 92 (6):725-734.

- Zheng HT, Peng ZH, Li S, He L. 2005. Loss of heterozygosity analyzed by single nucleotide polymorphism array in cancer. *World J Gastroenterol*, 11 (43):6740-6744.

8. Anhang

- Ehrenwörtliche Erklärung
- Lebenslauf
- Danksagung

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Prof. Dr. T. Deufel
Dr. rer. nat. C. Beetz
Dr. med. M. Brodhun

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Frankfurt / Main, 27.05.2008

Thomas Hoffmann

Lebenslauf

1. Persönliches

Name	Thomas Hoffmann
Geburtsdatum	11.01.1982
Geburtsort	Schlema (Kreis Aue)
Familienstand	ledig

2. Schullaufbahn

08 / 88 – 06 / 92	POS Dr. Richard Sorge, Altenburg
08 / 92 – 06 / 97	Gymnasium Platanenstraße, Altenburg
08 / 97 – 06 / 00	Sportgymnasium „J.C.F. GutsMuths“, Jena
06 / 00	Abitur

3. Zivildienst

09 / 00 – 08 / 01	Zivildienst am Klinikum der Friedrich-Schiller-Universität Jena
-------------------	--

4. Studium

seit 10 / 01	Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
03 / 04	Physikum
02 / 07 – 06 / 07	1. Tertial des Praktischen Jahres am Kreiskrankenhaus Altenburg / Fachbereich Innere Medizin
06 / 07 – 10 / 07	2. Tertial des Praktischen Jahres am Helios-Klinikum Erfurt / Fachbereich Pädiatrie
11 / 07 – 01 / 08	3. Tertial des Praktischen Jahres am Helios-Klinikum Erfurt / Fachbereich Chirurgie
04 / 08 - 05 / 08	2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
05 / 08	Approbation als Arzt

Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. T. Deufel für die Bereitstellung des Themas und sein persönliches Interesse am Verlauf und den Ergebnissen der Untersuchungen.

Meinen Dank möchte ich des Weiteren an Herrn Dr. C. Beetz, Frau Stein und Frau von der Gönne für ihre umfassende Betreuung während der verschiedenen Arbeitsschritte richten.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern für ihre bedingungslose Unterstützung und das entgegengebrachte Vertrauen. Sie bildeten die Grundlage für diese Arbeit.

Danken möchte ich meiner Freundin Claudia, deren Zuneigung für mich auch abseits der Forschungsarbeiten eine Quelle der Kraft und Motivation darstellt.

Abschließend möchte ich Herrn Sebastian Klein für seine aufopferungsvolle Hilfsbereitschaft danken.

Frankfurt / Main, 27.05.2008

Thomas Hoffmann